

Die Bedeutung von Hypoxia-inducible-factor und des von-Hippel-Lindau Proteins für die renale Reninexpression

Histologische Untersuchungen an Mäusen mit reninzellspezifischer Vhl-Gendefizienz



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
MEDIZIN DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE
MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Kathrin Schucht

aus
München

im Jahr
2015

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 22.05.15

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. med. Armin Kurtz

Die Bedeutung von Hypoxia-inducible-factor und des von-Hippel-Lindau Proteins für die renale Reninexpression

Histologische Untersuchungen an Mäusen mit reninzellspezifischer Vhl-Gendefizienz



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
MEDIZIN DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE
MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Kathrin Schucht

aus
München

im Jahr
2015

Dekan:	Prof. Dr. Ernst Tamm
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Armin Kurtz
2. Berichterstatter:	PD Dr. Rudolf Fuchshofer
Tag der mündlichen Prüfung:	15.10.2015

Die vorliegende Arbeit wurde durch Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz angeregt und entstand im Zeitraum von August 2011 bis September 2013 unter der Anleitung von Frau Dr. Birgül Kurt am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	8
1.1. Das systemische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	9
1.2. Juxtaglomeruläre Zelle und Reninexpression.....	10
1.3. Herkunft der reninbildenden Zellen, renale Reninexpression während der Nephrogenese und Phänomen der Rekrutierung	13
1.4. Zelluläres O ₂ -Mangelsignaling: Das HIF-System und seine Kontrolle durch VHLp.....	18
1.5. Zielsetzung	23
2. Material & Methoden.....	25
2.1. Material	26
2.1.1. Geräte	26
2.1.2. Verbrauchsmaterial	27
2.1.3. Chemikalien	28
2.1.4. Puffer und Lösungen	29
2.1.5. Antikörper.....	30
2.2. Methoden	31
2.2.1. Versuchstiere.....	31
2.2.2. Anfertigung von Paraffinschnitten	32
2.2.3. Immunhistochemische Färbung.....	33
2.2.4. Erstellung dreidimensionaler Rekonstruktionen.....	35
2.2.5. Software und Internetdienste	38
3. Ergebnisse.....	39
3.1. Reninexpression in der reninzellspezifisch Vhl-defizienten Maus	40
3.1.1. Abundanz und Morphologie reninbildender Zellen in der reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Maus	40
3.1.2. Lokalisation reninbildender Zellen in der reninzellspezifisch Vhl-defizienten Maus	52
3.2. Gefäßbaumentwicklung in der reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Maus.....	88

4. Diskussion	100
4.1. Erläuterungen zum verwendeten Mausmodell.....	101
4.2. Vergleich der histologischen Befunde mit molekularbiologischen Befunden	102
4.3. Reninexpression in der reninzellspezifisch Vhl-defizienten Maus	106
4.4. Lokalisation reninexprimierender Zellen in der reninzellspezifisch Vhl-defizienten Maus	113
4.5. Gefäßbaumentwicklung in der reninzellspezifisch Vhl-defizienten Maus	114
4.6. Zusammenfassung und Ausblick	120
5.Zusammenfassung.....	122
6.Abstract	126
7.Literaturverzeichnis	130
8.Anhang.....	148

1.Einleitung

1.1. Das systemische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das systemische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist einer der wichtigsten Regulatoren des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes des Körpers sowie des Blutdrucks.

Seine Aufgabe erfüllt das RAAS mittels einer Enzymkaskade, an deren Anfang als Schlüsselregulator die Protease Renin steht. Diese wird zum größten Teil in den sogenannten juxtaglomerulären Zellen der Niere synthetisiert und dort in Vesikeln bis zu ihrer kontrollierten Freisetzung gespeichert. Im Plasma wandelt Renin das Glykoprotein Angiotensinogen, das hauptsächlich in Leber und Fettgewebe gebildet wird, in Angiotensin I um. Dieses wird wiederum durch das Angiotensin-I-Konversionsenzym (ACE) zu Angiotensin II verkürzt. ACE wird sowohl endothelgebunden - in besonders hohen Konzentrationen in der Lunge - als auch im Plasma gefunden. Angiotensin II ist der eigentliche Effektor des RAAS und wirkt über Angiotensin-Rezeptoren (AT), von denen derzeit zwei Typen bekannt sind (AT1 und AT2). Angiotensin II bewirkt über AT1-Rezeptoren einen Anstieg des Extrazellulärvolumens, indem es in der Nebennierenrinde die Aldosteronproduktion anregt - und somit die Natrium- und Wasserresorption in Verbindungstubuli und Sammelrohren - , im proximalen Tubulus die Natriumresorption fördert, die Sekretion von ADH aus dem Hypophysenhinterlappen stimuliert, sowie zentral Durstgefühl und Salzhunger auslöst. Außerdem bewirkt Angiotensin II die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen und bewirkt somit eine Erhöhung des Blutdrucks. Im Sinne einer Schlüsselrolle des Renins im RAAS wirkt sich ein erhöhter Blutdruck bzw. ein Salzüberschuss im Körper über eine negative Rückkoppelung hemmend auf die Reninsekretion aus (Abb. 1.1) (Lang et Kurtz, 2007).

In den letzten Jahren ist jedoch mit der Entdeckung der lokalen Renin-Angiotensin-Systeme, weiterer Komponenten des RAAS, wie beispielsweise Ang 1-7, oder des Proreninrezeptors das Konzept des RAAS deutlich komplexer geworden (Bader et al., 2001; Nguyen, 2011; Ferrario et al., 1998; Castrop et al., 2010).

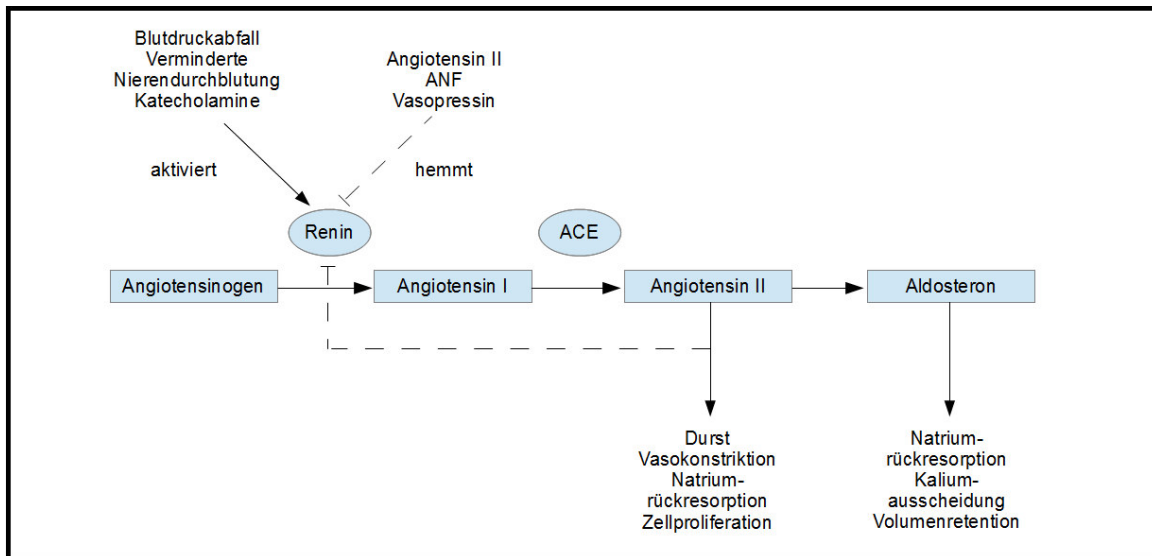


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des systemischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)
Abbildung nach <http://www.urologielehrbuch.de/01/RAAS.jpg>.

1.2. Juxtaglomeruläre Zelle und Reninexpression

Ein Großteil des im Körper befindlichen Renins ist renalen Ursprungs. In der Niere wird Renin überwiegend in speziellen Zellen exprimiert, die sich in der Mediaschicht der afferenten Arteriolen befinden und zwar unmittelbar vor deren Eintritt in den Glomerulus, am sogenannten vaskulären Pol (Abb. 1.2). Diese Zellen ähneln Myofibroblasten und aufgrund ihrer besonderen Position werden sie als juxtaglomeruläre Zellen bezeichnet. Sie haben eine charakteristische kuboide Form, die auf die mit Renin gefüllten sekretorischen Granula im Zellinneren zurückzuführen ist und derenhalber sie auch als Epitheloidzellen bezeichnet werden (Taugner et al., 1979; Barajas, 1979 ; Hackenthal et al., 1990; Kurtz, 2012).

Zusammen mit den Zellen der Macula densa und des extraglomerulären Mesangiums bilden sie den juxtaglomerulären Apparat (Barajas, 1970; Barajas, 1979; Kon, 1999). Selten und speziesabhängig exprimieren auch Mediazellen der efferenten Arteriolen oder mesangiale Zellen Renin (Kon, 1999). In den juxtaglomerulären Zellen synthetisiertes Renin wird zu ca. 80% konstitutiv als Prorenin sezerniert, als welches es sowohl systemische als auch lokale Wirkung entfaltet. Zu 20% wird es als Renin in sekretorischen Vesikeln gespeichert, um bei Bedarf zur Aufrechterhaltung der Homöostase freigesetzt zu werden (Pratt et al., 1987; Morris, 1992; Kurtz, 2012).

Die Sekretion von Renin scheint über einen der Compound-Exozytose ähnlichen Mechanismus stattzufinden. Nur wenige Vesikel treten in Kontakt mit der Zellmembran, durch Verschmelzung der Vesikel untereinander wird jedoch der Inhalt vieler Vesikel sezerniert (Steppan et al., 2013; Friis et al., 2013).

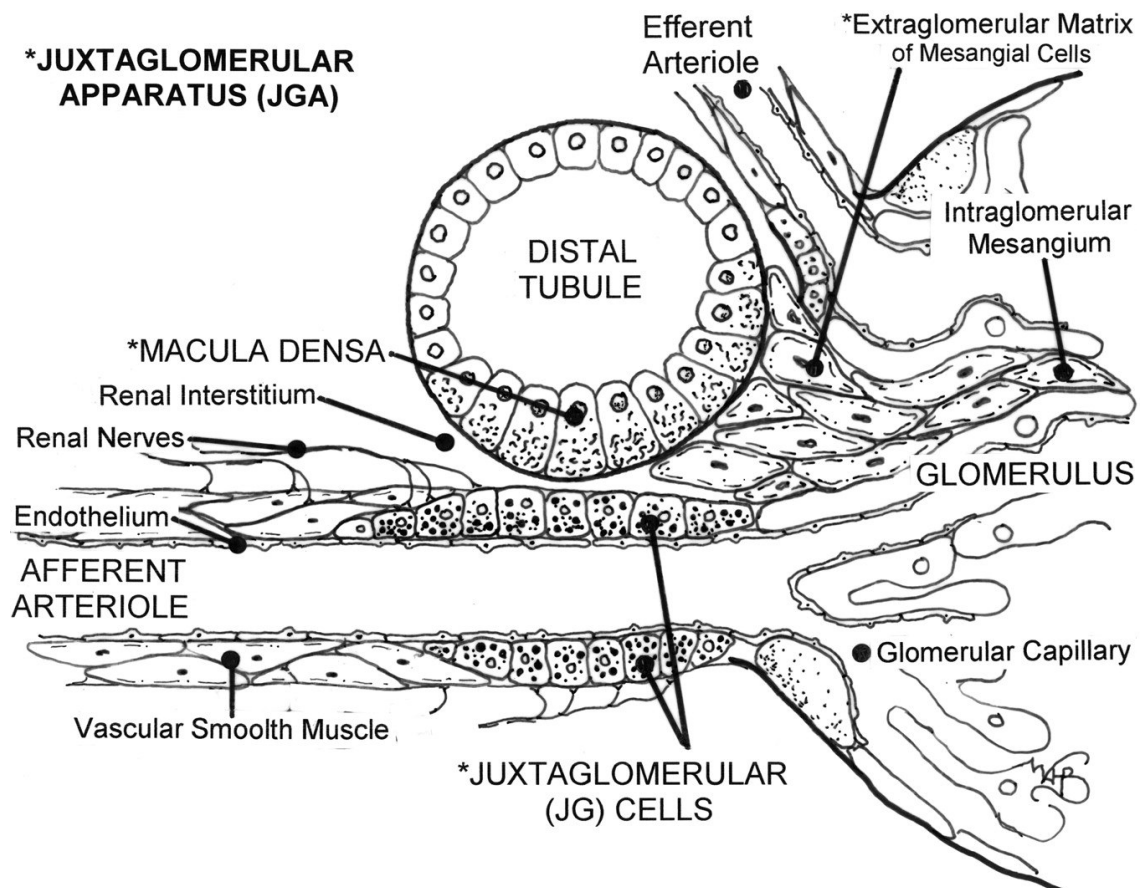


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des vaskulären Pols eines Glomerulus. Sternchen markieren die Komponenten des juxtaglomerulären Apparates. Abbildung aus Beierwaltes, 2010.

Die Regulation der Reninsekretion durch die juxtaglomeruläre Zelle ist komplex und wird sowohl durch lokale als auch durch systemische Faktoren beeinflusst.

Auf systemischer Ebene sind Blutdruck und Salzaufnahme wichtige regulative Faktoren für die Reninsekretion, wobei beide in inverser Weise mit der Reninsekretion korrelieren (Davis et Freeman, 1976; Castrop et al., 2010). Arterielle Barosensoren erfassen den systemischen Blutdruck, worauf das sympathische Nervensystem die Reninsekretion

anpasst (Trasher, 2002; Barrett et al., 2003; Kurtz, 2012). Über β_1 -Rezeptoren auf den juxtaglomerulären Zellen nimmt es einen direkten, positiven Einfluss auf die Reninsekretion. Zudem agiert es indirekt über α_1 -Rezeptoren, die eine Vasokonstriktion der präglomerulären Arteriolen vermitteln und somit den lokalen Perfusionsdruck verändern (Ehmke et al., 1989). Das sympathische Nervensystem scheint einer der wichtigsten Faktoren für die Aufrechterhaltung einer basalen Reninexpression und -sekretion zu sein (Holmer et al., 1994; Castrop et al., 2010). Zusätzlich beeinflussen diverse Hormone, Autakoide und andere Faktoren Reninsynthese und -freisetzung, wobei hier dem Hormon Angiotensin II im Rahmen des negativen Feedbackmechanismus des RAAS eine wichtige Rolle zukommt (Kurtz, 2011; Castrop et al., 2010).

Auf lokaler Ebene wird die Reninsekretion tubulär, vaskulär und neuronal reguliert. Tubulär wird die Reninfreisetzung im Rahmen des juxtaglomerulären Feedbacks an die tubuläre NaCl-Konzentration angepasst, wobei sich tubuläre NaCl-Konzentration und Reninsekretion invers verhalten (Skott et Briggs, 1987; Schnermann et Briggs, 2013). Vaskulär scheinen Endothel- und Glattmuskelzellen unter anderem über Botenstoffe wie NO, Adenosin/ATP, Endotheline und Prostanoiden Einfluss auf die Reninsekretion zu nehmen (Castrop et al., 2010). Neuronal kontrollieren Neurotransmitter, die aus in der Nähe der juxtaglomerulären Zellen zahlreich vorhandenen Nervenendigungen freigesetzt werden, die Reninexpression und -sekretion (Abb. 1.2) (Bader et Ganten, 2000; Castrop et al., 2010; Kurtz, 2011). Zu den lokalen Kontrollfaktoren der Reninsekretion zählt auch der Perfusionsdruck in der Nierenarterie (Skinner et al., 1963; Finke et al., 1983; Fahri et al., 1983; Imagawa et al., 1984; Castrop et al., 2010; Kurtz, 2011; Friis et al., 2013). Allgemein werden alle Mechanismen, welche Änderungen im lokalen renalen Perfusionsdruck erfassen und an die juxtaglomerulären Zellen kommunizieren, unter dem Begriff des renalen Barorezeptors zusammengefasst. Neben dem sympathischen Nervensystem, welches die Reninsekretion in Abhängigkeit vom systemischen Blutdruck moduliert, gilt der renale Barorezeptor als zweite wichtige Kontrollinstanz, welche die Reninsekretion an den Blutdruck anpasst. An Hunden konnte gezeigt werden, dass der intrarenale Barorezeptor wichtig für die tägliche Einstellung des Blutdrucks ist (Ehmke et al., 1987; Kurtz, 2012).

Auf zellulärer Ebene kontrollieren drei wichtige sekundäre Messenger Reninsynthese und -sekretion: cAMP, cGMP sowie die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Positiv wird die Reninfreisetzung über cAMP reguliert, hierbei ist die Proteinkinase A involviert. Negativer Regulator der Reninsekretion ist die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, wobei sich hier ungewöhnlicherweise hohe Calciumkonzentrationen negativ und niedrige positiv auf die Reninfreisetzung auswirken – ein Phänomen, welches auch als das Calcium-Paradoxon bezeichnet wird. Der sekundäre Messenger cGMP kann die Reninsekretion situationsabhängig sowohl positiv als auch negativ beeinflussen (Hackenthal et al., 1990; Kurtz et Wagner, 1999; Beierwaltes, 2010; Castrop et al., 2010; Kurtz, 2011; Atchison et Beierwaltes, 2013; Friis et al., 2013).

Auf DNA-Ebene scheinen im Reningen unter anderem im Bereich des Promotors ein cAMP-responsive-element (CRE), sowie Bindestellen für HOX-PBX, PPAR- γ und Ets-1, im Enhancerbereich ein weiteres CRE mit angrenzender E-Box sowie eine Bindestelle für PPAR- γ und schließlich eine sich zwischen proximalem Promotor und Enhancerbereich befindende Bindestelle für einen zentralen Transkriptionsfaktor der Notch-Signalkaskade (RBP-J/Su(H)/LAG1/CBF1) für die Regulation der Reningenexpression von Bedeutung zu sein (Glenn et al., 2013).

1.3. Herkunft der reninbildenden Zellen, renale Reninexpression während der Nephrogenese und Phänomen der Rekrutierung

Während der Entwicklung folgen die reninbildenden Zellen einem charakteristischen Verteilungsmuster entlang des renalen Gefäßbaums, welches bei verschiedensten Säugetieren nachgewiesen wurde (Gomez et al., 1989; Minuth et al., 1981; Jones et al., 1990; Kon et al., 1989; Kon et al., 1994). In frühen Stadien der Nierenentwicklung befinden sich reninbildende Zellen in der Wand größerer intrarenaler Gefäße. Im Laufe der Nephrogenese wandert die Reninexpression in einem zentrifugalen Muster entlang des sich entwickelnden Gefäßbaums in Richtung der afferenten Arteriolen, bis sie schließlich zum Abschluss der Nierenentwicklung ihre klassische juxtaglomeruläre

Position einnimmt. Im Adultstadium findet sich eine Reninexpression unter Normalbedingungen nur am vaskulären Pol sowie zum Teil in an den vaskulären Pol direkt angrenzenden Abschnitten der afferenten Arteriolen (Minuth et al., 1981; Gomez et al., 1989; Gomez et Norwood, 1995; Reddi et al., 1998; Sauter & Machura et al., 2008). Der enge räumliche und zeitliche Zusammenhang zwischen der renalen Gefäßbaumentwicklung und dem Muster der Reninexpression während der Nierenentwicklung lassen einen Einfluss reninbildender Zellen auf die renale Gefäßbaumentwicklung vermuten (Gomez et Norwood, 1995; Reddi et al., 1998; Sequeira Lopez et Gomez, 2011). Wie und ob überhaupt das Auftreten reninbildender Zellen in Zusammenhang mit der renovaskulären Entwicklung steht, ist bis heute nicht klar (Pentz et al., 2004; Pan et al., 2005; Sauter & Machura et al., 2008; Neubauer et al., 2009; Tufro-McReddie et al., 1995; Matsusaka et al., 2002). Vor Kurzem wurde jedoch gezeigt, dass reninbildende Zellen eine Reihe von Genen exprimieren, die für den Vorgang der Angiogenese von Bedeutung sind (Brunskill et al., 2011).

Woher genau die reninbildenden Zellen stammen ist unklar. Es konnte gezeigt werden, dass in Mäusen am Embryonaltag 11 bereits alle für die Gefäßausbildung nötigen Vorläuferzellen im metanephrischen Blastem vorhanden sind (Sequeira Lopez et al., 2001) und es wird angenommen, dass die Reninzellvorläuferzellen von mesenchymalen Foxd1 positiven Vorläuferzellen abstammen (Abb. 1.3) (Sequeira Lopez et Gomez, 2011). Obwohl reninbildende Zellen später α SMA (α smooth muscle actin) aufweisen, schließen sich zu Beginn der Nierenentwicklung die Expression von Renin und α SMA gegenseitig aus. Dies lässt auf verschiedene renale Vorläuferzellen für reninbildende Zellen und Glattmuskelzellen schließen (Sequeira Lopez et al., 2001). Interessanterweise fungieren jedoch reninbildende Zellen auch als Vorläufer für renovaskuläre Glattmuskelzellen, sodass für diese mindestens zwei verschiedene Entwicklungswege zu existieren scheinen (Abb. 1.3). Außerdem wurde gezeigt, dass reninbildende Zellen nicht nur Vorläufer für juxtaglomeruläre Zellen und Glattmuskelzellen des arteriellen Nierengefäßbaumes sind, sondern auch für Zellen des glomerulären Mesangiums sowie einige Epithelzellen der glomerulären Kapsel und des proximalen Tubulus (Sequeira Lopez et al., 2004).

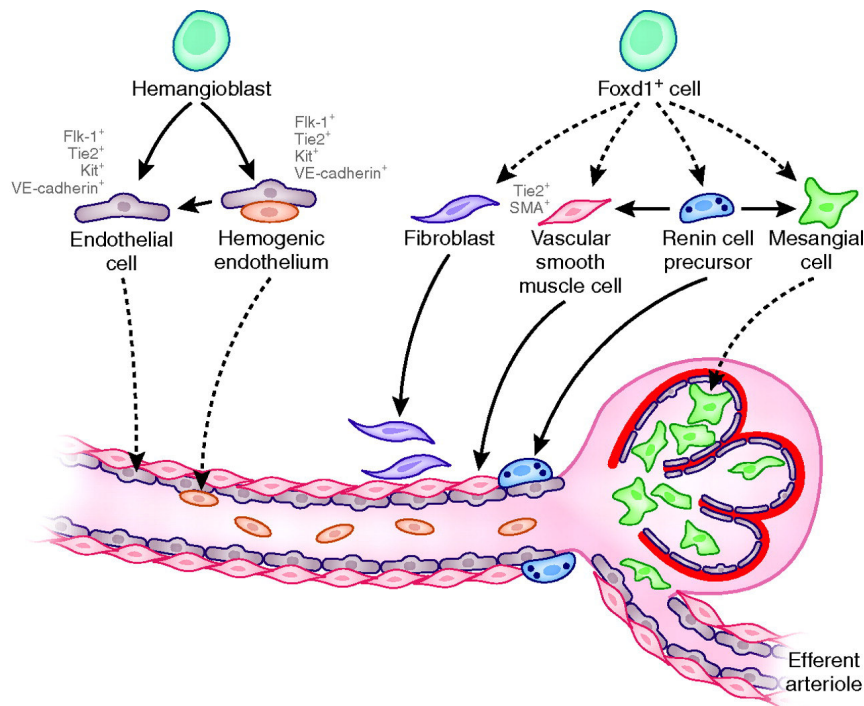


Abb. 1.3 Darstellung der Herkunft der Zellen, welche die Wand der afferenten Arteriole bilden.

Derzeit wird davon ausgegangen, dass die Wand der renalen Arteriolen aus hauptsächlich zwei Vorläuferzelllinien hervorgeht: Hämangioblasten und Foxd1+ Vorläuferzellen. Während sich aus den Hämangioblasten das Endothel entwickelt, sollen reninbildende Zellen von Foxd1+ Vorläuferzellen abstammen. Reninexprimierende Zellen können ihrerseits wieder Vorläufer für vaskuläre Glattmuskelzellen sowie mesangiale Zellen sein. Durchgehende Pfeile zeigen bereits demonstrierte Verhältnisse, während die gestrichelten Pfeile mögliche Beziehungen zwischen den Zellen anzeigen. In grau sind phänotypische Marker der jeweiligen Zellen angegeben. Graphik aus und Erläuterung nach Sequeira Lopez et Gomez, 2011.

Diese Erkenntnisse sind interessant im Zusammenhang mit dem Phänomen der sogenannten Rekrutierung. Befindet sich die Homöostase des Salz- und Wasserhaushalts des Körpers im Sinne einer Hypotension oder eines zu geringen Salzgehaltes des Körpers in Gefahr bzw. sinkt der renale Perfusionsdruck, so reagiert das RAAS darauf mit der Rekrutierung zusätzlicher reninbildender Zellen in der Wand der präglomerulären Arteriolen, teilweise auch im Glomerulus sowie im Niereninterstitium (Cantin et al., 1977; Gomez et al., 1988a; Gomez et al., 1990; Machura et al., 2012). Die Menge des im Blut zirkulierenden Renins wird also nicht durch eine verstärkte Reninsekretion von Seiten der bereits vorhandenen reninbildenden Zellen gesteigert, sondern durch eine Erhöhung der Anzahl reninexprimierender Zellen (Cantin et al., 1977; Gomez et al., 1990; Kim et al., 1999). Interessanterweise ähnelt das Muster der renalen Reninexpression in Folge einer solchen Rekrutierung dem, welches während der Nierenentwicklung

gefunden wird (Abb. 1.4). Sequeira Lopez und ihre Mitarbeiter konnten zeigen, dass nur solche Zellen zur Reninbildung rekrutiert werden, welche während der Nierenentwicklung bereits schon einmal Renin exprimiert haben (Sequeira Lopez et al., 2004). Umgekehrt wird bei länger anhaltender Hypertension oder einem zu hohen Salzgehalt des Körpers die Anzahl reninbildender Zellen reaktiv verringert (Taugner et al., 1982; Machura et al., 2012). Als Regulatoren werden bei diesen Vorgängen renale Nerven sowie der renale Perfusionsdruck vermutet (Friis et al., 2013).

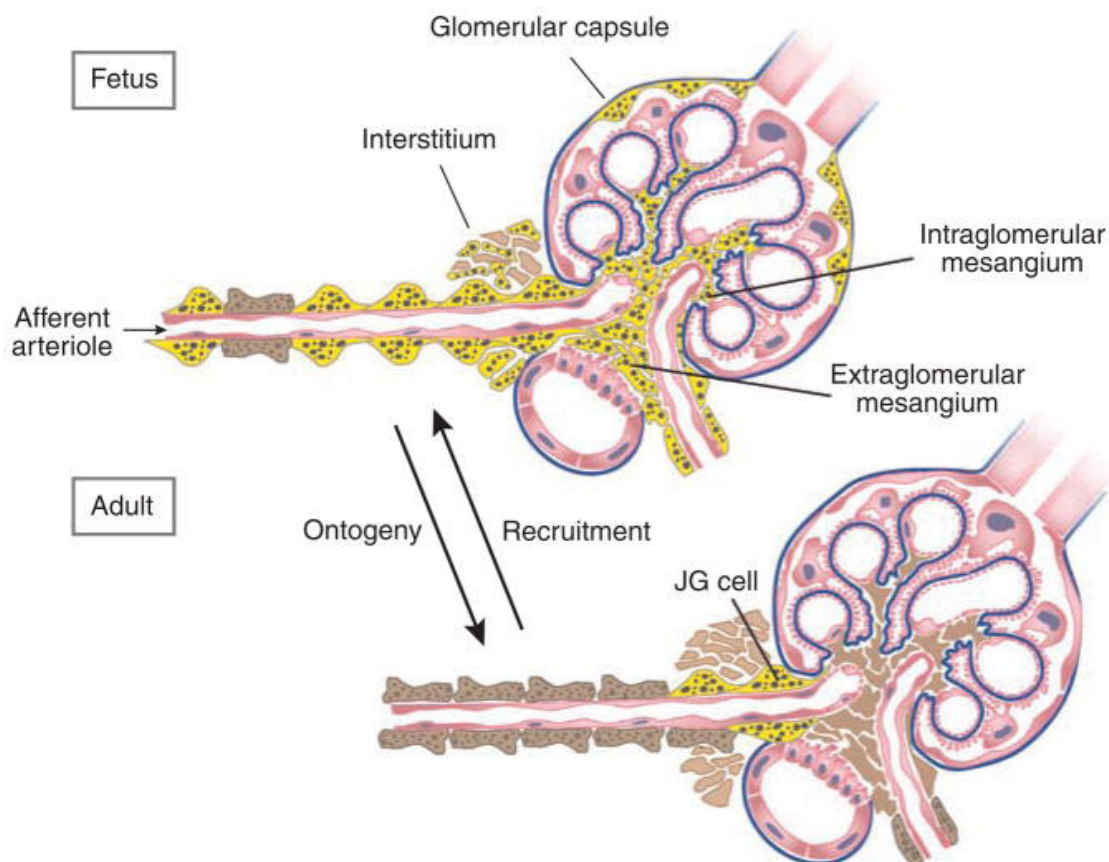


Abb. 1.4 Muster der Verteilung reninexprimierender Zellen während der Nierenentwicklung und dem Vorgang der sogenannten Rekrutierung im Adultstadium.

Im Adultstadium exprimieren unter Normalbedingungen nur einige wenige am vaskulären Pol gelegene Zellen Renin (braun gepunktete, gelbe Zellen). Während der Nierenentwicklung hingegen, finden sich zahlreiche reninexprimierende Zellen auch in den intrarenalen Arterien, in den Glomeruli sowie im interstitiellen Nierengewebe. Die Verteilung reninexprimierender Zellen in Reaktion auf eine Stimulation des RAAS im Adultstadium gleicht der Verteilung der reninbildenden Zellen während der Nierenentwicklung. Das Ausmaß der Rekrutierung und somit der Zunahme reninexprimierender Zellen wird durch Qualität, Ausmaß sowie Dauer des jeweiligen Stimulus bestimmt. Im Normalfall beschränkt sich die Rekrutierung auf Zellen der afferenten Arteriolen. Unter starken Stimulationsbedingungen können jedoch auch weiter stromaufwärts im Gefäßbaum, im intra- sowie extraglomerulären Mesangium, im Niereninterstitium sowie selten in der glomerulären Kapsel sowie den efferenten Arteriolen reninexprimierende Zellen gefunden werden (Gomez et Sequeira Lopez, 2009). Graphik aus und Erläuterung nach Gomez et Sequeira Lopez, 2009.

Die zellulären Mechanismen, welche das Muster der Reninexpression während der Nierenentwicklung steuern bzw. welche dem Phänomen der Rekrutierung und somit der reversiblen Reprogrammierung vaskulärer Zellen hin zu reninexprimierenden Zellen zugrunde liegen, sind bis heute unklar. Jedoch wurden in diesem Bereich in den letzten Jahren einige interessante Erkenntnisse gewonnen.

So scheint die funktionelle Verbindung reninbildender Zellen untereinander und mit benachbarten Zellen über verschiedene Connexine für das Phänomen der Rekrutierung von entscheidender Bedeutung zu sein (Kurtz et al., 2009) sowie einen Einfluss auf das korrekte Ausbilden des Reninzellphänotyps zumindest im Adultstadium zu haben (Kurtz et al., 2009; Krattinger et al., 2007). Ebenso scheint der cAMP-Signalweg sowie damit verbundenes Chromatin-Remodeling wichtig für die Induktion und Aufrechterhaltung des Reninzellphänotyps zu sein (Chen et al., 2007; Neubauer et al., 2009; Pentz et al., 2008; Gomez et al., 2009). Auch spielen wohl microRNAs für das Erlangen und den Erhalt des Reninzellphänotyps eine Rolle. Es wurden bestimmte microRNAs identifiziert, die an der Regulation der Balance zwischen Reninproduktion und Kontraktilität und somit auch an Rekrutierungsvorgängen bzw. De-/Umdifferenzierungsvorgängen von Zellen der Reninzelllinie beteiligt zu sein scheinen (Sequeira Lopez et al., 2010; Medrano et al., 2012). Außerdem wurde für den Notch-Signalweg eine Bedeutung sowohl für den Erhalt des Reninzellphänotyps als auch für die Regulation von Rekrutierungsvorgängen in Reaktion auf eine Bedrohung der Homöostase des Salz- und Wasserhaushalts postuliert (Castellanos Rivera et al., 2011; Pan et al., 2005).

1.4. Zelluläres O₂-Mangelsignaling: Das HIF-System und seine Kontrolle durch VHLp

Das Vorhandensein einer adäquaten Sauerstoffmenge ist für die meisten Zellen ein überlebenswichtiges Kriterium. Die Sauerstoffkonzentration im Gewebe kann über das Schicksal von Zellen entscheiden. Von ihr unter anderem hängt es ab, ob diese sich differenzieren, proliferieren oder ob sie die Apoptose einleiten (Lin et al., 2008). Sauerstoffmangel wird intrazellulär mit Hilfe des HIF (Hypoxia-inducible-factor)-Systems kommuniziert.

Im Falle eines Sauerstoffmangels im Gewebe bildet sich aus den zwei Untereinheiten HIF α und HIF β ein Transkriptionskomplex (Jiang et al., 1996). Durch das Binden an HRE-Elemente (hypoxia-response-element) in Promotoren leitet dieser die Expression hypoxieinduzierbarer Gene ein, wie z.B. VEGF, EPO oder GLUT-1 (Semenza, 2000). Das HIF-System steht unter Kontrolle des von-Hippel-Lindau Proteins (VHLp), des Genprodukts des Vhl-Gens (Maxwell et al., 1999). VHLp ist Teil eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (Pause et al., 1997; Lonergan et al., 1998; Kamura et al., 1999; Stebbins et al., 1999; Lisztwan et al., 1999; Iwai et al., 1999), welcher unter Normoxie HIF α ubiquitiniert und somit dessen Abbau im Proteasom bewirkt (Ohh et al., 2000). Unter Normalbedingungen befinden sich die HIF α -Isoformen im Zytosol und werden dort an Prolyresten durch verschiedene Isoformen von HIF-Prolylhydroxylasen (PHD1, PHD2 und PHD3) O₂- und Fe²⁺-abhängig hydroxyliert (Epstein et al., 2001; Bruik et McKnight, 2001; Schofield et Ratcliffe, 2004). Dies ermöglicht eine Bindung der HIF α -Isoformen durch VHLp (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Yu et al., 2001) und hat deren Ubiquitinierung und anschließende Degradation im Proteasom zur Folge (Ohh et al., 2000). Bei O₂-Mangel hingegen wird HIF α stabilisiert, da die Prolylhydroxylasen in Abwesenheit von O₂ nicht funktionsfähig sind. Somit kann VHLp nicht binden und der Abbau im Proteasom nicht eingeleitet werden. HIF α transloziert in den Zellkern (Kallio et al., 1998), wo es zusammen mit HIF β , welches dort konstitutiv exprimiert wird (Hoffman et al., 1991; Pollenz et al., 1994), den HIF-Transkriptionskomplex bildet (Abb. 1.7).

Alle HIF-Untereinheiten gehören zur Familie der bHLH-PAS Proteine (basic-helix-loop-helix (bHLH)-Per-Arnt-Sim (PAS) domain containing proteins). Von der Untereinheit HIF α

sind drei verschiedene Isoformen bekannt, HIF1 α (Semenza et Wang, 1992), HIF2 α (Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Hogenesch et al., 1997; Tian et al., 1997) und HIF3 α (Gu et al., 1998), die sich hinsichtlich ihrer Verteilung im Gewebe und ihrer Zielgenspezifität unterscheiden (Jain et al., 1998; Hu et al., 2007; Bernhardt et al., 2006; Haase, 2006). Sie können alle Heterodimere mit der HIF- β /ARNT-Untereinheit bilden (Semenza, 1999). Hinsichtlich ihres Aufbaus und ihrer Funktionsweise sind sich HIF1 α und HIF2 α sehr ähnlich. In ihrer Aminosäuresequenz sind die beiden Proteine zu 48% identisch, in den Bereichen bestimmter Domänen stimmen sie in bis zu 85% der Aminosäuren überein (Tian et al., 1997). An ihrem N-terminalen Ende besitzen beide Proteine die sogenannten HLH und PAS Domänen, welche für die Heterodimerbildung wichtig sind, sowie basische Regionen, die für die Bindung an das HRE-Element benötigt werden (Wang et al., 1995; Jiang et al., 1996; Ema et al., 1997; Tian et al., 1997). C-terminal befindet sich die Oxygen-Dependent-Degradation-Domain (ODD), wo Hydroxylierung an Prolylresten durch Prolylhydroxylasen und anschließende Ubiquitinierung durch VHLp stattfinden, sowie eine C-terminale und eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (C-TAD bzw. N-TAD) (Jiang et al., 1997; Pugh et al., 1997; O'Rourke et al., 1999; Freeburg et Abrahamson, 2003; Hu et al., 2007). Die Funktion der N-TAD ist jeweils spezifisch für HIF1 α und HIF2 α . Von dieser Domäne wird vermutet, dass sie bei der unterschiedlichen Zielgenspezifität der beiden HIF α -Untereinheiten eine Rolle spielt, beispielsweise über eine Interaktion mit unterschiedlichen Transkriptionscofaktoren (Abb. 1.5) (Hu et al., 2007).

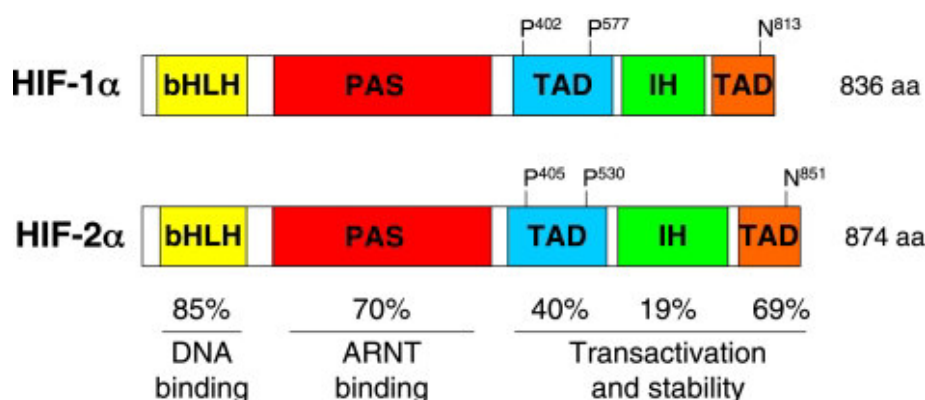
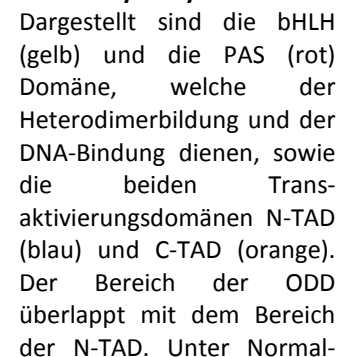


Abb. 1.5 Veranschaulichung der hohen Sequenzhomologie zwischen HIF1 α und HIF2 α . Die beiden HIF α -Isoformen weisen eine hohe Sequenzhomologie im Bereich ihrer bHLH (gelb) und PAS-Domänen (rot) auf. Diese beiden Domänen dienen der Heterodimerbildung sowie der DNA-Bindung. Im Bereich der C-TAD (orange) herrscht ebenfalls eine hohe Homologie. In der inhibitorischen Domäne (grün) sowie der N-TAD (blau) unterscheiden sich die beiden Isoformen hingegen stärker, mit Ausnahme von 30 Aminosäuren, welche die beiden hydroxylierbaren Prolin-Reste umgeben. Die Prozentangaben beziehen sich auf einander entsprechende Aminosäuresequenzen. Abbildung aus und Erläuterung nach Hu et al., 2007.

möhen dienen der Heterodimerbildung sowie der DNA-Bindung. Im Bereich der C-TAD (orange) herrscht ebenfalls eine hohe Homologie. In der inhibitorischen Domäne (grün) sowie der N-TAD (blau) unterscheiden sich die beiden Isoformen hingegen stärker, mit Ausnahme von 30 Aminosäuren, welche die beiden hydroxylierbaren Prolin-Reste umgeben. Die Prozentangaben beziehen sich auf einander entsprechende Aminosäuresequenzen. Abbildung aus und Erläuterung nach Hu et al., 2007.



In den letzten Jahren kristallisierte sich heraus, dass das HIF-System deutlich komplexer ist, als zu Beginn angenommen (Koh et Powis, 2012; Greer et al., 2012). Neben dem akuten zellulären O₂-Mangelsignaling sind für das HIF-System noch weitere Funktionen bekannt, beispielsweise während der Entwicklung von Knochen und Gefäßsystem oder bei der Regulation des Stammzellstatus (Koh et Powis, 2012). Neben dem klassischen HIF-Signalweg finden sich andere, unabhängige Funktionen der HIF α -Untereinheiten und es wurde davon berichtet, dass HIF α -Untereinheiten zum Teil Hypoxie-unabhängig stabilisiert werden (Mukherjee et al., 2011). Zudem existieren Interaktionen mit anderen Signalwegen, wie beispielsweise mit dem Notch-Signalweg (Gustafsson et al., 2005; Chen et al., 2010; Pistollato et al., 2010; Greer et al., 2012) oder mit der Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren (Oikawa et al., 2001; Elvert et al., 2003; Aprelikova et al., 2006; Hu et al., 2007; Patel et Simon, 2008).

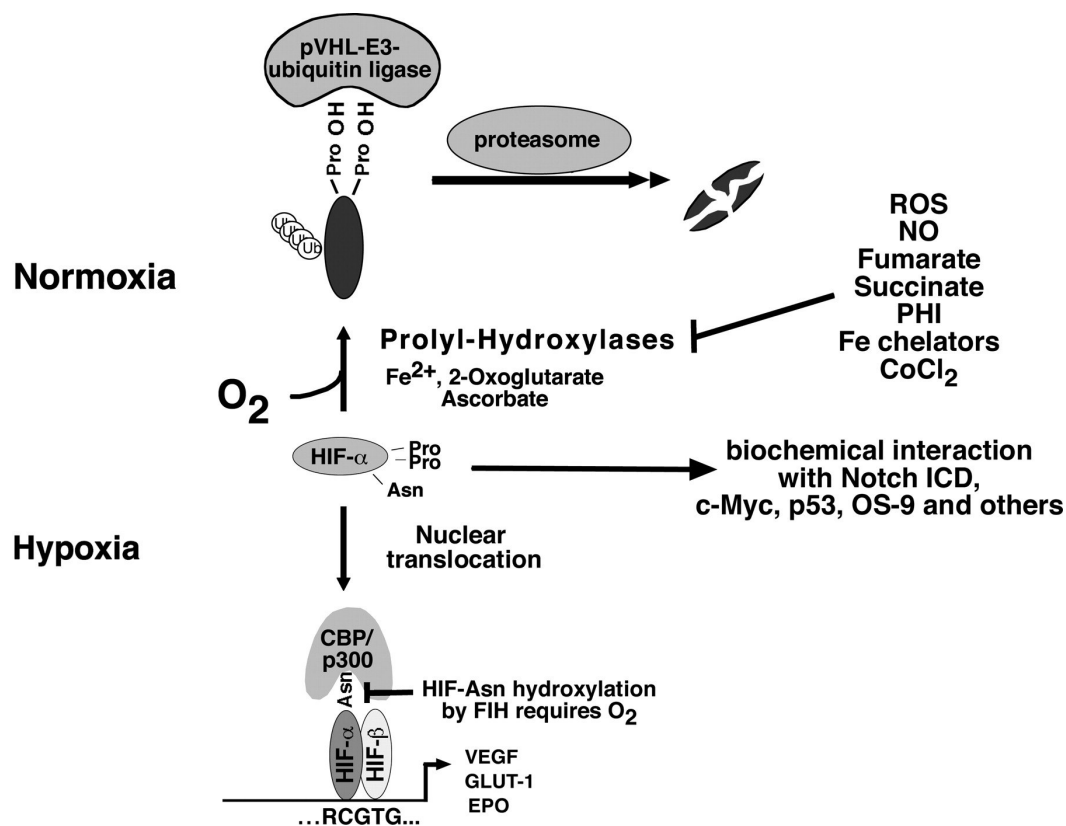


Abb. 1.7 Der klassische HIF-Signalweg und alternative Wirkweisen von HIF.

Bei Normoxie hydroxyliert die Prolylhydroxylase HIF α an zwei Prolin-Resten, wobei sie O_2 , Fe^{2+} , Ascorbat und 2-Oxoglutarat benötigt. Der pVHL-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex kann somit binden, HIF α wird polyubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. Bei Hypoxie oder unter anderen Umständen, unter welchen die Prolylhydroxylase inaktiv ist, kann HIF α nicht abgebaut werden und transloziert in den Zellkern. Hier bildet es ein Heterodimer mit HIF β , bindet an ein HRE-Element und fördert die Transkription von Zielgenen, wie beispielsweise Erythropoietin (EPO), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und dem Glukose-1-Transporter (GLUT-1). FIH (Factor-Inhibiting-HIF) ist eine sauerstoffabhängige Asparagin-Hydroxylase, die mittels der Hydroxylierung eines Asparaginrestes in der C-TAD die Rekrutierung von Cofaktoren moduliert. Alternative Wirkweisen von HIF α ergeben sich aus biochemischen Interaktionen mit anderen Proteinen, wie beispielsweise mit Notch ICD (Notch intracellular domain). Abbildung aus und Erläuterung nach Haase, 2006.

Das Vhl-Gen ist Ursprung zweier Genprodukte, eines Proteins der molekularen Masse von ca. 30kDA (pVHL₃₀) und eines von ca. 19kDA (pVHL₁₉). Dies erklärt sich durch das Vorhandensein eines internen Startkodons im Gen für pVHL₃₀, sodass pVHL₁₉ aus einer verkürzten Form des Vhl-Gens hervorgeht. Beide Proteine können mit Elongin B, C und Cul2 des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes interagieren, die Expression hypoxieinduzierbarer Gene unterdrücken und haben Tumorsuppressorfunktion. Allerdings scheinen sie sich zum Teil hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation zu unterscheiden (Schoenfeld et al., 1998; Iliopoulos et al., 1998; Blankenship et al., 1999).

Hergovich et al. vermuteten, pVHL₁₉ erfülle vor allem die klassische Ubiquitinase-Funktion des VHL-Proteins, wohingegen pVHL₃₀ auch HIF-unabhängige Funktionen habe, wie beispielsweise die Regulierung der Mikrotubuli des Zytoskeletts. Dies erscheint plausibel im Kontext von Konsequenzen, die bei Punktmutationen im Vhl-Gen beobachtet wurden, und angesichts der Tatsache, dass pVHL₃₀ Aminosäuresequenzen besitzt, die bei pVHL₁₉ aufgrund der Expression eines verkürzten Ausschnitts des Vhl-Gens fehlen (Hergovich et al., 2003). Da jedoch beide Proteine die Tumorsuppressorfunktion erfüllen, werden sie im Allgemeinen unter dem Begriff des von-Hippel-Lindau Proteins (VHLp) zusammengefasst.

Homozygoter Verlust bzw. Mutation des Gens für VHLp gehen mit der Ausbildung diverser Tumoren einher. Charakteristisch für viele der Tumoren mit einem Defekt im Vhl-Gen ist eine Hypervaskularität (Kondo et Kaelin, 2001). Ein zellulärer Defekt bzw. Verlust beider Vhl-Gene kann entweder spontan auftreten, wie es beispielsweise beim sporadischen, klarzelligen Nierenzellkarzinom meist der Fall ist (Gnarra et al., 1994; Shuin et al., 1994; Whaley et al., 1994), oder im Rahmen der genetischen von-Hippel-Lindau Krankheit (Collins, 1894; von-Hippel, 1904; Lindau, 1926; Cushing et Bailey, 1928; Melmon et Rosen, 1964; Latif et al., 1993; Maher et Kaelin, 1997; Kaelin, 2007). Träger der Krankheit leiden an einer heterozygoten Mutation des Vhl-Gens. Im Sinne von Knudsons two-hit Hypothese (Knudson, 1971; Knudson, 1986) geht der spontane Verlust bzw. eine Mutation des zweiten Vhl-Gens mit der Bildung diverser Tumoren einher. Typische mit dem von-Hippel-Lindau Syndrom assoziierte Tumore sind unter anderem Hämangioblastome der Retina, des Kleinhirns und des Rückenmarks, klarzellige Nierenzellkarzinome, Phäochromozytome und Inselzelltumore des Pankreas. Hinzu kommen zystische Veränderungen verschiedener Organe, besonders häufig in Nieren und Pankreas (Kaelin, 2007). Wie genau die Defekte im Bereich des Vhl-Gens mit der Ausbildung der Tumoren zusammenhängen, ist noch unklar (Kaelin, 2007; Kaelin, 2008; Bader et Hsu, 2012). Die Hypervaskularität der Tumoren wird auf eine fehlende Regulation des HIF-Systems durch VHLp und eine daraus folgende Überproduktion vaskulärer Wachstumsfaktoren zurückgeführt. Aber auch HIF-unabhängige Faktoren scheinen bei der Ausbildung der Tumoren eine Rolle zu spielen (Hughes et al., 2007).

Beispielsweise scheint VHLp HIF-unabhängig an der Kontrolle der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Ohh et al., 1998; Bishop et al., 2004; Stickle et al., 2004; Kurban et al., 2006; Tang et al., 2006; Hughes et al., 2007) sowie an der Regulation der Mikrotubuli des Zytoskeletts beteiligt zu sein (Hergovich et al., 2003; Lolkema et al., 2004; Schermer et al., 2006; Kaelin, 2008; Kapitsinou et Haase, 2008). Interessant ist in diesem Zusammenhang die starke Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp bei der von-Hippel-Lindau Krankheit. Sie konnte in mehrere Subtypen eingeteilt werden, deren Phänotyp in direktem Zusammenhang mit dem jeweiligen genetischen Defekt im Vhl-Gen zu stehen scheint (Kaelin, 2007).

1.5. Zielsetzung

In letzter Zeit entwickelten sich die Erkenntnisse über das Phänomen der Reninzellrekrutierung und des entwicklungsbedingten An- und Abschaltens der renalen Reninexpression derart, dass angenommen wird, die Reninzellvorläuferzellen bzw. später die Zellen der renalen Gefäßwand wechselten bei diesen Abläufen zwischen verschiedenen Differenzierungszuständen hin und her (Sequeira Lopez et al., 2001; Sequeira Lopez et al., 2004; Gomez et al., 2009; Medrano et al., 2012). Mit dem Notch-Signalweg, dem Enzym Dicer sowie spezifischen microRNAs sind Faktoren an der embryonalen sowie adulten Regulierung des Reninzellphänotyps beteiligt, welche allgemein zelluläre Differenzierungszustände zu beeinflussen scheinen (Castellanos Rivera et al., 2011; Sequeira Lopez et al., 2010; Medrano et al., 2012). Auch das Connexin-Expressionsmuster reninbildender Zellen während Entwicklung, Adultstadium und Rekrutierungsvorgängen wäre mit der Theorie vereinbar, dass Änderungen des renalen Reninexpressionsmusters mit der Änderung des Differenzierungsstatus der betroffenen Zellen einhergehen (Kurtz et al., 2009).

Basierend auf diesen Erkenntnissen soll in dieser Arbeit ein weiterer Faktor untersucht werden, der zelluläre Differenzierungszustände beeinflussen kann: Hypoxie (Genbacev et al., 1997; Morrison et al., 2000; Jögi et al., 2002). Speziell soll die Bedeutung des Hypoxia-inducible-factor (HIF) für die Regulation des Reninzellphänotyps untersucht

werden. HIF wird in hypoxischen Zellen stabilisiert und agiert als Transkriptionskomplex, welcher die Genexpression der Zelle an die Sauerstoffmangelbedingung anpasst (Semenza, 2004). Es ist denkbar, dass Zellen der Wand des renalen Gefäßbaums während der Nierenentwicklung im noch nicht vollständig ausgebildeten Gefäßbaum mit ungewöhnlich niedrigen Sauerstoffkonzentrationen konfrontiert werden. Auch im Falle der Rekrutierung reninbildender Zellen im Adultstadium, beispielsweise bei einer Minderdurchblutung der Niere in Folge von Hypotension oder einer Nierenarterienstenose ist es denkbar, dass Zellen in der Wand des renalen Gefäßbaums hypoxische Zustände erdulden müssen.

Um zu erfahren, ob HIF an der Induktion der zellulären Reninexpression beteiligt ist, sollen in dieser Arbeit exemplarisch dreidimensionale Teilrekonstruktionen der Gefäßbäume von $Vhl^{-/-REN}$ -Mäusen nach einer von Sauter & Machura etablierten Methode erstellt werden (Sauter & Machura et al., 2008). Bei diesen Mäusen wurde mittels des Cre-LoxP-Systems das Vhl-Gen selektiv in reninexprimierenden Zellen ausgeschaltet. In Abwesenheit von VHLp kann HIF nicht abgebaut werden und wird stabilisiert, sodass in den Zellen der Zustand eines Sauerstoffmangels simuliert wird. Anhand der 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen soll geprüft werden, ob sich die dauerhafte Stabilisierung von HIF in den Zellen auf das Muster der Reninexpression unter Normalbedingungen sowie nach Stimulation des RAAS auswirkt. Da sowohl für reninbildende Zellen als auch für HIF eine Rolle bei der renalen Gefäßbaumentwicklung postuliert wurde (Gomez et Norwood, 1995; Reddi et al., 1998; Sequeira Lopez et Gomez, 2011; Freeburg et Abrahamson, 2003), soll zudem untersucht werden, ob die Gefäßbäume der Knockout-Tiere morphologische Auffälligkeiten aufweisen.

2.Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Modell&Hersteller</i>
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Filtersets	
TRITC-Filter: Anregung 533-558nm Emission 570-640nm	Filter set 43, Zeiss, Jena
Cy2-Filter: Anregung 450-490nm Emission 500-550nm	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Canada
Grafikkarte	Quadro FX 4500, NVIDIA, Wurselen
Inkubationsschrank	Modell B6200, Heraeus, Hanau
Kühl- und Gefrierschränke	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Magnetrührer	MR 80, Heidolph, Schwabach
Mikroskop	Axiovert 200M, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore , Schwalbach
PH-Meter	Digital pH-Meter; Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA

Scantisch	motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controller), Ludl Electronic Products, München
Schüttler	SM25, Edmund Bühler, Hechtlingen
Vortexgeräte	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA REAX1, Heidolph, Schwabach
Waagen	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen Feinwaage W13, Mettler, Gießen
Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach
Wärmetopf	PSI, HOT POT 1.411.80/l
Zentrifugen	Labofuge 400, Heraeus, Hanau Biofuge haemo, Heraeus, Hanau Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Verbrauchsmaterial

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach

Niedrigsalzfutter 0,02% NaCl	Ssniff, Soest
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Eppendorf 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Falcon 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Feather, Köln

2.1.3. Chemikalien

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Chloroform	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Enalapril	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Isopropanol	Merck, Darmstadt
K₂HPO₄ x 2 H₂O	Merck, Darmstadt
KH₂PO₄	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt

Na₂HPO₄ x 12 H₂O	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.4. Puffer und Lösungen

Wenn nicht explizit anders beschrieben, wurden die Chemikalien für Puffer und Lösungen in bidestilliertem Wasser gelöst.

Fixierlösung (Methyl-Carnoy-Lösung)

Methanol	60%
Chloroform	30%
Eisessig	10%

Fixierlösung für Perfusion

PBS (Phosphate Buffered Saline)
Paraformaldehyd 3%

PBS-(Phosphate Buffered Saline) Puffer

NaCl 136 mM
KCl 2,7 mM
Na₂HPO₄ x 2 H₂O 10,1 mM
KH₂PO₄ 1,8 mM

PBS-Otto-Puffer, pH 7,4

K₂HPO₄ x 3 H₂O 10 mM
 NaCl 140 mM
 KH₂PO₄ 10 mM

Waschpuffer

PBS-Otto-Puffer
 BSA (Bovine Serum Albumin) 1%

Blockierlösung

PBS-Otto-Puffer	
BSA (Bovine Serum Albumin)	1%
HS (Horse Serum)	10%

2.1.5. Antikörper

Antikörper Art

Hersteller

Chicken Anti-Renin (murine) IgG

Primärantikörper Davids Biotech,
 Regensburg

Mouse Anti-αSMA (murine) IgG

Primärantikörper Beckman Coulter,
 München

**Donkey Anti-Chicken IgY
 TRITC-conjugated**

Sekundärantikörper Dianova, Hamburg

**Donkey Anti-Mouse IgG
 Cy2-conjugated**

Sekundärantikörper Dianova, Hamburg

2.2. Methoden

2.2.1. Versuchstiere

Die in dieser Arbeit untersuchten reninzellspezifisch Vhl-defizienten Knockout-Mäuse (Kurt et al., 2013) waren aus der Kreuzung von Tieren, bei welchen beide Allele für das Vhl-Gen gefloxt waren (Haase et al., 2001), mit solchen, welche heterozygot für das Cre-Rekombinase-Gen unter der Kontrolle des endogenen Ren-1d-Promotors waren (Sequeira Lopez et al., 2004), hervorgegangen. Diese Tiere wurden unserem Labor freundlicherweise von Dr. Carsten Willam von der Friedrich-Alexander Universität in Erlangen und Dr. R. Ariel Gomez von der University of Virginia in Charlottesville, USA, zur Verfügung gestellt.

Untersucht wurden die Nieren von Tieren des Genotyps $Vhl^{-/-REN}$. Bei diesen Tieren sind beide Allele für das Vhl-Gen gefloxt und sie exprimieren Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des endogenen Promotors eines ihrer beiden Ren-1d-Allele, während das andere Ren-1d-Allel wildtypisch ist. Als Kontrolltiere wurden entsprechende Geschwistertiere des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ verwendet, deren beide Vhl-Allele gefloxt, deren beide Ren-1d-Allele jedoch wildtypisch waren. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte mittels PCR durch Analyse von aus der Schwanzspitze isolierter genomischer DNA.

Untersucht wurden Tiere, welche unter Normalbedingungen gehalten worden waren und solche, bei welchen eine Stimulation des RAAS stattgefunden hatte. Die Stimulation des RAAS erfolgte in den letzten drei Lebenswochen der Tiere durch die Fütterung einer Nidrigsalzdiät (0,02%NaCl) und zusätzliche Gabe des ACE-Hemmers Enalapril über das Trinkwasser (ca. 10mg/kg/d).

Die Entnahme der Nieren erfolgte im Alter von 8-12 Wochen. Pro Versuchstier wurde jeweils eine Niere für molekularbiologische und eine für histologische Untersuchungen verwendet.

Alle Versuchstiere wurden gemäß der Richtlinien der Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals des U.S. National Institut of Health behandelt. Durchgeführte Versuche wurden durch die lokale Ethikkommission genehmigt. Es wurde zu jeder Zeit auf optimale Haltungparameter für Nager geachtet (Temperatur $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$, Hell-Dunkelintervall 12h, Futter und Wasser ad libitum).

Zur Fixierung des Gewebes für histologische Untersuchungen wurden die Mäuse unter Anästhesie mit 3%igem Para-Formaldehyd in PBS perfundiert.

Kreuzung und Aufzucht der Mäuse, Genotypisierung sowie Perfusion wurden von Frau Dr. Birgül Kurt durchgeführt und die fixierten Nieren freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.2.2. Anfertigung von Paraffinschnitten

Einbettung in Paraffin

Pro Versuchstier standen zwei halbe Nieren zur Paraffineinbettung zur Verfügung. Unmittelbar nach der Perfusion wurden diese bis zur Einbettung in 70%igem Methanol bei 4°C gelagert.

Zur Vorbereitung auf die Paraffineinbettung musste das Nierengewebe schrittweise dehydriert werden. Hierzu wurden die Nierenhälften in Gewebe-Einbettkassetten in eine Methanolreihe aufsteigender Konzentration überführt. [2x (70 %, 80 %, 90 %, 100%) je 30min]. Anschließend wurde das Gewebe in Isopropanol gespült (2x 30min), um dann durch eine dritte Spülung mit erwärmtem Isopropanol (45°C , 30min) schonend auf die Einbettung vorbereitet zu werden. Bei der endgültigen Paraffineinbettung wurde wie folgt vorgegangen: Lagerung in einem Isopropanol/Paraffin(1:1)-Gemisch (55°C , 30min), Inkubation in reinem Paraffin (60°C , 2x mind. 24h) mit anschließender Überführung des

paraffin-durchtränkten Gewebes in mit 60°C warmem Paraffin gefüllte Silikon-Kautschuk-Einbettförmchen und Aushärtung bei Raumtemperatur.

Anfertigung von Paraffinschnitten

Für die histologische Färbung und anschließende digitale Rekonstruktion des Nierengefäßbaumes wurden von jeder Niere lückenlose Serien feinsten Gewebeschnitte benötigt. Hierzu wurde das in Paraffin eingebettete Gewebe auf kleine Holzklötzchen aufgeblickt und mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms 5µm dicke Serienschnitte von 80-100 Schnitten pro Serie angefertigt. Die Schnitte wurden in einem 40°C warmen Wasserbad gestreckt, auf superfrost plus Objektträger aufgezogen und schließlich bei 40°C ca. 12h im Wärmeschrank getrocknet. Die Lagerung der Objektträger bis zur Färbung erfolgte bei 4°C.

2.2.3. Immunhistochemische Färbung

Entparaffinieren

Für die immunhistochemische Färbung mussten die Paraffinschnitte entparaffiniert werden. Dies geschah nach folgendem Protokoll:

Überführen der Schnitte in Xylol (2x 10min), in absolutes Isopropanol (2x5min) und schließlich in eine Isopropanolreihe absteigender Konzentration (96%, 80%, 70%, jeweils 5min).

Immunhistochemische Färbung

Zur Detektion bestimmter Gewebsbestandteile, in diesem Fall der reninexprimierenden Zellen und der Gefäßwand, wurden die Gewebeschnitte immunhistochemisch gefärbt. Verwendet wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung, bei welcher die gesuchten Zellstrukturen mittels eines Antikörperkomplexes und eines daran gekoppelten Fluorophors erkannt werden.

Hierbei bindet zunächst ein primärer Antikörper an das gesuchte Antigen, in einem zweiten Färbeschritt bindet dann ein sekundärer Antikörper an den primären Antikörper. Dies geschieht, da der zweite Antikörper sich gegen Antigene richtet, die spezifisch sind für die Wirtsspezies, aus welcher der primäre Antikörper gewonnen wurde. An den sekundären Antikörper wurde ein Fluorophor konjugiert. Dieser emittiert nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge Licht, wodurch die gesuchte Struktur sichtbar gemacht werden kann.

Auf den angefertigten Gewebeschnitten wurden spezifisch reninexprimierende Zellen sowie die Gefäßwand unter Verwendung folgender Antikörper angefärbt:

Primäre Antikörper: Mouse Anti- α -SMA (1:50, verdünnt in Blockierlösung)
 Chicken Anti-Renin (1:400, verdünnt in Blockierlösung)

Sekundäre Antikörper: Cy2 Donkey Anti-Mouse (1:400, verdünnt in Waschpuffer)
 TRITC Donkey Anti-Chicken (1:400, verdünnt in Waschpuffer)

Der Waschpuffer besteht aus PBS-Otto-Puffer mit 1%BSA (Bovine Serum Albumin). Die Blockierlösung setzt sich aus Waschpuffer mit 10% HS (Horse Serum) zusammen. PBS-Otto-Puffer, pH 7,4, besteht aus bidestilliertem Wasser mit $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ 10 mM, NaCl 140 mM und KH_2PO_4 10 mM. PBS-Puffer besteht aus bidestilliertem Wasser mit NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 10,1 mM und KH_2PO_4 1,8 mM.

Zum Färbevorgang wurden die entparaffinierten Schnitte dreimal für 5-10min in einer Küvette mit PBS-Puffer auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger von Pufferlösung gereinigt und die Schnitte mit Liquid-Blocker umrandet, um ein Abfließen der anschließend aufzutragenden Blockierlösung zu verhindern. Besonders war hier, wie auch während des gesamten Färbevorgangs darauf zu achten, dass die Schnitte nicht austrockneten. Nach dem Auftragen der Blockierlösung verblieben die Schnitte für 20min auf dem Schüttler. Hierbei sollten durch Blockade unspezifischer Antigene spätere unspezifische Bindungen

vermindert werden. Nach dem Absaugen der Blockierlösung von den Objektträgern wurden die in Blockierlösung verdünnten primären Antikörper auf die Schnitte aufgetragen und diese in Feuchtkammern bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte dreimal für 5-10min in einer Küvette mit Waschpuffer gewaschen. Bei der Herstellung der Antikörperverdünnung war, wie auch während des restlichen Färbeporgangs darauf zu achten, dass die Antikörper nicht mit Licht in Kontakt kommen, da die lichtsensiblen Fluorophore sonst ihre lichtemittierenden Eigenschaften verloren hätten. Vor dem Auftragen des verdünnten sekundären Antikörpers auf die Schnitte wurde die Lösung 10min zentrifugiert, um sie von störenden Kristallen zu befreien.

Im Folgenden wurden die Schnitte für 90min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur im Dunklen mit dem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend dreimal für 5-10min in PBS im Dunklen gewaschen. Das Eindeckeln der Objektträger erfolgte unter der Verwendung von Mounting Medium (Glycergel) und die Schnitte wurden im Weiteren bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.4. Erstellung dreidimensionaler Rekonstruktionen

Mikroskopie und Bilddigitalisierung

Zur Digitalisierung der gegen Renin und Glattmuskelaktin doppelt immunfluoreszent gefärbten Schnitte wurden folgende technische Hilfsmittel verwendet:

Ein Axiovert200M Mikroskop mit den entsprechenden Fluoreszenzfiltersets und motorisierter Objektauflage, eine Schwarzweiß-CCD-Kamera (AxioCamMRM) sowie die Software AxioVision von Zeiss.

Die Aufnahme der einzelnen Gewebeschnitte erfolgte in 100-facher Vergrößerung. Die Anregung des Fluorophors Cy2 (Carbocyanin) erfolgte mit einer Wellenlänge von 450-490nm; er emittierte hierauf eine Wellenlänge von 500-550nm, sodass das Aktin der glatten Gefäßmuskulatur in Grün sichtbar wurde. TRITC (Tetramethyl Rhodamin-

Isothiocyanat) wurde mit einer Wellenlänge von 533-558nm angeregt und emittierte 570-640nm, wodurch die Reninzellen in Rot sichtbar wurden.

Wichtige Parameter, wie beispielsweise die Belichtungszeit, wurden während der Aufnahme einer Schnittserie streng konstant gehalten.

Durch die Erzeugung von Overlay-Bildern konnten beide Kanäle in einer einzigen Bilddatei abgebildet werden.

Eine Konvertierung aus dem ursprünglichen Datenformat der *.zvi-Datei in *.TIFF-Dateien erfolgte, um das für die Weiterverarbeitung der Bilder benötigte Format von 8 Bit ohne Qualitätsverlust zu erreichen. Mittels des Bildanalyse-Programms Image J (Wayne Rasband, NIH, USA) wurden die Bildserien zu einem Stack - einem Stapel von Bildern gleicher Größe - verarbeitet, um diese zur Erstellung von 3D-Rekonstruktionen verwenden zu können.

Erstellung dreidimensionaler Rekonstruktionen

Für die Erstellung von 3D-Rekonstruktionen erfolgte der Datenimport in die Amira 5.4.0 Visualization Software auf einem Dell Precision 690 Computer System.

Eine korrekte Skalierung der erstellten Daten und Rekonstruktionen wurde ermöglicht, indem die dreidimensionale Bildeinheit Voxel entsprechend der verwendeten Kamera, des verwendeten Objektivs und der Schichtdicke der Schnitte definiert wurde. (Bei einer Verwendung des 10x Objektivs gilt: 1Pixel = $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$; die Schichtdicke der Schnitte betrug $5\mu\text{m}$; für ein Voxel gilt somit: $1\text{Voxel} = 1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$).

Bei der Erstellung von 3D-Rekonstruktionen erfolgt eine Datensegmentierung, d.h. die Daten bzw. die Signale werden in mehreren Untergruppen zusammengefasst. Hierbei unterscheiden die Rekonstruktionssoftware bzw. der Anwender die Signale aus den Färbungen anhand der Grauwerte der Pixel. Einzelne Signale gleicher Graustufe werden zu einem Datensatz zusammengefasst und können graphisch dreidimensional dargestellt werden. Damit Gefäßwand und reninexprimierende Zellen unterschiedlichen Segmenten

zugewiesen werden konnten, erfolgte vor Beginn der Rekonstruktion eine Auftrennung der Overlay-Bilder in die ursprünglichen beiden monochromen Farbkanäle.

Bevor die Daten segmentiert werden konnten, mussten die Bilder aligned, d.h. in eine identische Orientierung gebracht, werden. Da sich die Gewebeschnitte aufgrund von Scherkräften im Rahmen des Schneidevorgangs individuell verziehen, musste dies für den Aktinkanal manuell geschehen. Durch Rotations- und Schiebebewegungen wurde eine möglichst exakte Deckungsgleichheit der im Vordergrund stehenden Strukturen erreicht. Der Reninkanal konnte unter Zuhilfenahme des bearbeiteten Aktinstapels als Referenz automatisch aligned werden.

Der wesentliche Schritt bei der Erstellung einer 3D-Rekonstruktion ist die Datensegmentierung bzw. das Labelling. Hier wird bestimmten Signalen oder Strukturen ein Material, d.h. eine Farbe, zugeteilt und diese werden somit in einem Datensatz zusammengefasst. Aus diesen Datensätzen können Oberflächen berechnet und graphisch dargestellt werden. Durch Kombination der errechneten Oberflächen in komplexen Netzwerken werden zusätzliche Auswertungen, wie die Bestimmung der Lage der einzelnen Strukturen zueinander, möglich.

Das Labelling der Gefäßwände und der reninexprimierenden Zellen geschah anhand der Fluoreszenzsignale aus den Färbungen, das Labelling der Glomeruli und der Nierenkapsel erfolgte rein manuell anhand mikroskopisch sichtbarer struktureller Merkmale des Gewebes.

Das Labelling der Fluoreszenzen kann durch die Amira Visualization Software unter bestimmten Bedingungen unter Zuhilfenahme der verschiedenen Graustufen der Pixel automatisch durchgeführt werden. Aufgrund feinsten Verziehungen oder Defekte der Gewebeschnitte, unterschiedlicher Intensitäten der Färbung auf den einzelnen Schnitten oder anderer technisch bedingter Störfaktoren, sind jedoch zahlreiche manuelle Korrekturen unumgänglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende 3D-Gefäßbaumteilkonstruktionen angefertigt: jeweils für eine Maus des Genotyps $Vhl^{-/-REN}$, welche unter Normalbedingungen aufgewachsen war, für eine, deren RAAS stimuliert worden war, sowie für entsprechende $Vhl^{fl/fl}$ -Geschwistertiere. Dargestellt wurden jeweils reninexprimierende Zellen, die Gefäßwand, Glomeruli sowie ein Ausschnitt der Nierenkapsel.

Anhand der errechneten Oberflächen wurden Abundanz, Lage und Verteilung der reninexprimierenden Zellen in den jeweiligen Genotypen analysiert. Des Weiteren wurden die jeweiligen Reninvolumina berechnet sowie Durchmesser und Länge der afferenten Arteriolen bestimmt. Anzumerken ist hierbei, dass die Methode der Längenbestimmung der afferenten Arteriolen anhand der 3D-Rekonstruktionen in Bezug auf Präzision nicht optimal ist, da rekonstruktionsbedingte Variabilitäten in der Länge der afferenten Arteriolen nicht vollständig vermieden werden können. Da zudem die Messwerte stark von der räumlichen Ebene abhängen, in welcher der Maßstab angelegt wird, wurde darauf geachtet den Maßstab stets mittig durch die Arteriole zu legen.

2.2.5. Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von Microsoft Office 2003 verfasst. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe von Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated, USA), dem Microsoft Office Picture Manager und ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA). Zur Mikroskopie wurde AxioVision Rel 4.5. von Zeiss verwendet und für die 3D-Rekonstruktionen Amira 5.4.0 Visualization Software (Mercury Computer Systems, Inc., USA). Die Tabellen wurden mittels Microsoft Office 2007 erstellt. Die gezeigten Graphen wurden unter Verwendung von GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA) erstellt. Literaturrecherche wurde unter Zuhilfenahme von PubMed des US National Center for Biotechnology durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

3.Ergebnisse

3.1. Reninexpression in der reninzellspezifisch Vhl-defizienten Maus

3.1.1. Abundanz und Morphologie reninbildender Zellen in der reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Maus

Um Rückschlüsse auf die Rolle des Vhl-Proteins in reninbildenden Zellen ziehen zu können, wurden zunächst Abundanz und Morphologie reninbildender Zellen in reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Mäusen ($Vhl^{-/-REN}$) und in Kontrollgeschwistertieren ($Vhl^{fl/fl}$) verglichen.

Analyse der Abundanz reninbildender Zellen mittels 3D-Gefäßbaumrekonstruktionen

Die Abundanz reninbildender Zellen im Nierengewebe von Tieren des Genotyps $Vhl^{-/-REN}$ und $Vhl^{fl/fl}$ wurde anhand von Gefäßbaumteilrekonstruktionen vergleichend analysiert. Angefertigt wurden Gefäßbaumteilrekonstruktionen von zwei Knockout-Kontroll-Pärchen: Eines war unter Normalbedingungen aufgewachsen, bei dem anderen hatte eine Stimulation des RAAS durch Fütterung einer Niedrigsalzdiät in Kombination mit der Gabe des ACE-Hemmers Enalapril über einen Zeitraum von 3 Wochen stattgefunden.

Beim Vergleich der Gefäßbaumteilrekonstruktionen des unter Normalbedingungen aufgewachsenen Knockout-Kontroll-Pärchens fällt auf, dass das $Vhl^{-/-REN}$ -Tier weniger reninbildende Zellen aufweist, als das entsprechende Kontrolltier (Abb. 3.1 und 3.2).

Ins Auge fällt, dass bei der reninzellspezifischen Vhl -Knockout-Maus viele afferente Arteriolen gänzlich frei von reninpositiven Zellen bleiben.

Im Gefäßbaum der Kontroll-Maus findet sich hingegen die klassische Lokalisation reninbildender Zellen, wie sie auch im Gewebe von Wildtypmäusen gefunden wird:

Am vaskulären Pol eines nahezu jeden Glomerulus können reninpositive Zellen gefunden werden. Diese befinden sich in klassischer, juxtaglomerulärer Position (Abb. 3.2 und 3.3).

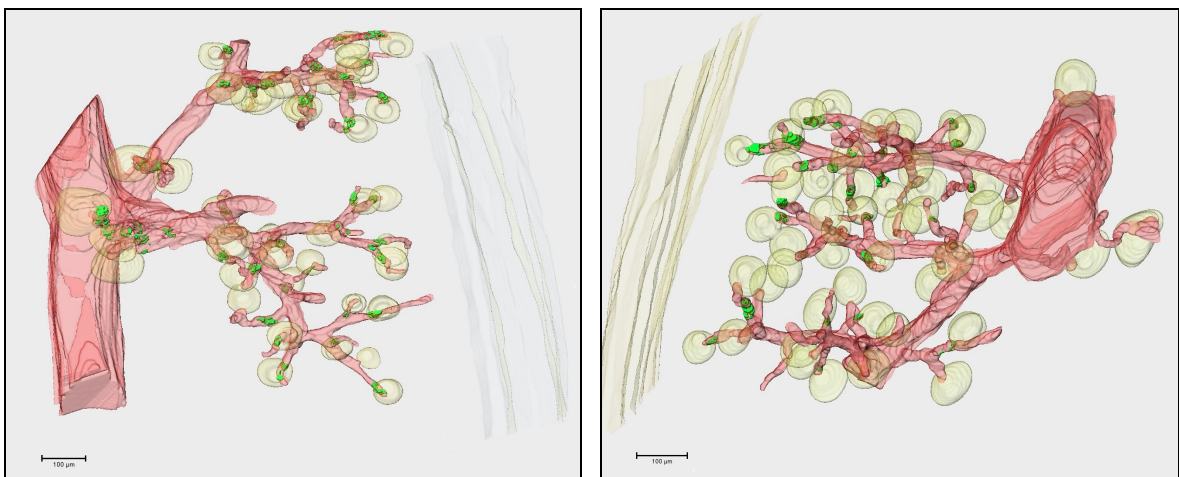


Abb. 3.1 3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (links) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (rechts). Dargestellt ist die Gefäßwand in Rot, die reninbildenden Zellen in Grün und die Glomeruli sowie die Kapsel in Gelb. Die Skala gibt jeweils 100µm an.

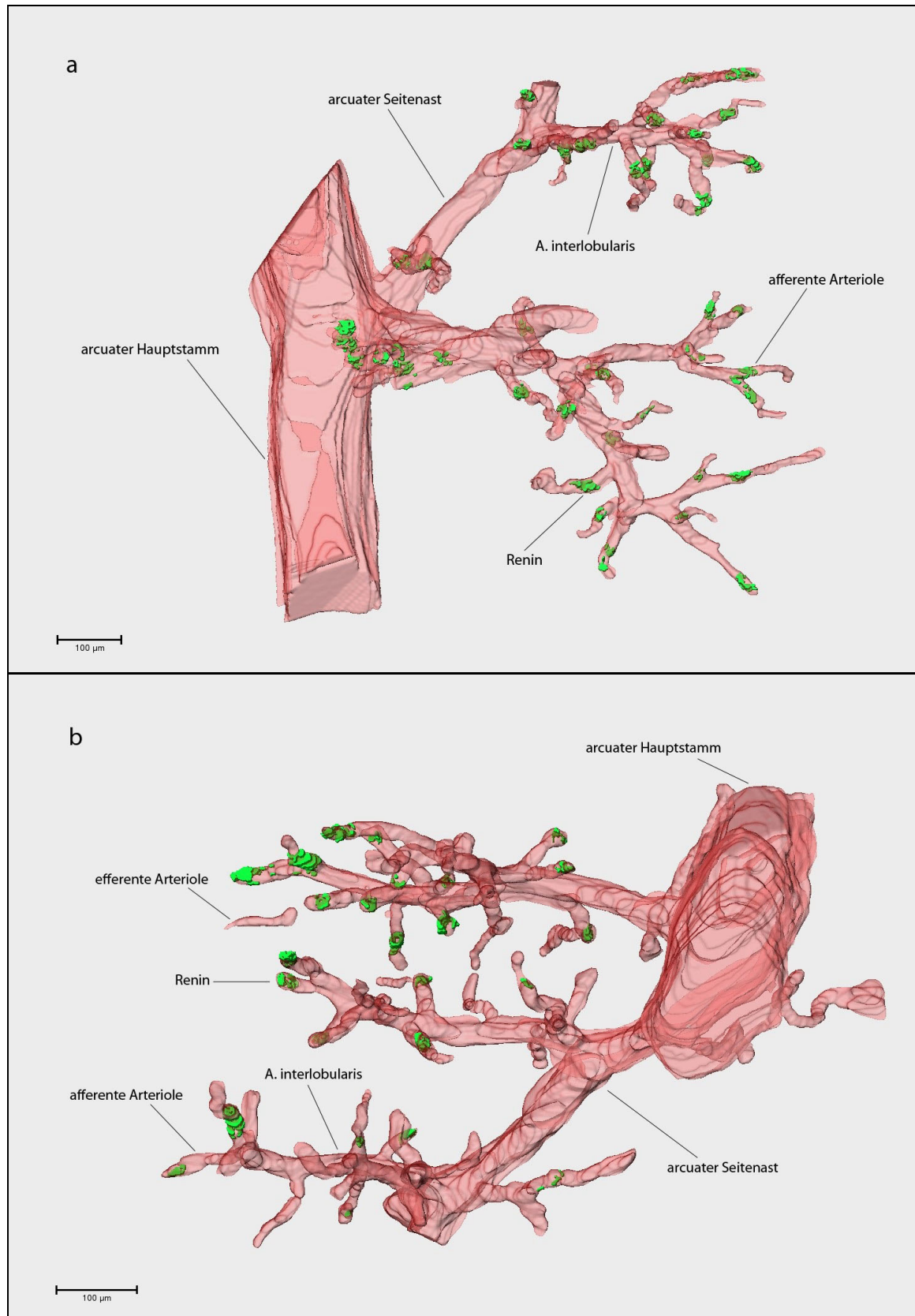


Abb. 3.2 3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumabschnitts einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b). Dargestellt sind nur der Gefäßbaum (rot) und die reninbildenden Zellen (grün). Die Skala gibt jeweils 100 μm an.

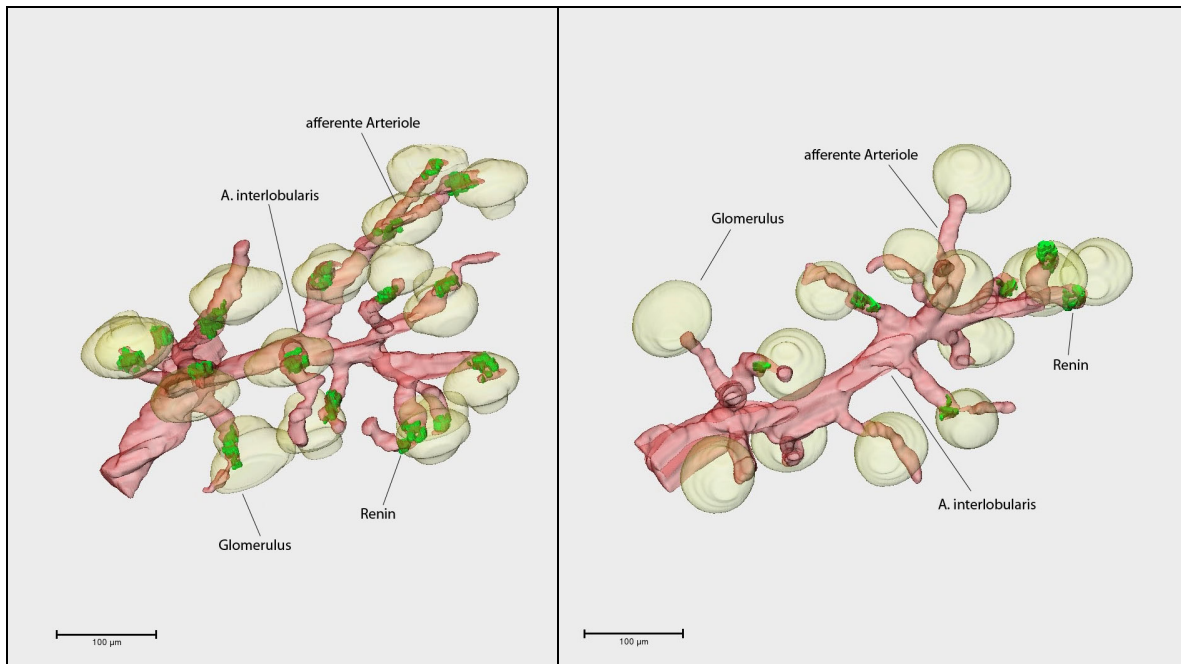


Abb. 3.3 3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten *Vhl^{fl/fl}*-Maus (links) und einer *Vhl^{-/-REN}*-Maus (rechts) - Ausschnitte der in Abb. 3.1 gezeigten Rekonstruktionen. Dargestellt ist die Gefäßwand in Rot, die reninbildenden Zellen in Grün und die Glomeruli in Gelb. Die Skala gibt jeweils 100µm an.

Die Analyse der Gefäßbaumteilrekonstruktionen der Tiere, bei welchen das RAAS durch Gabe von Nidrigsalzfutter und Enalapril stimuliert worden ist, zeigt, dass auch hier die Anzahl reninbildender Zellen im *Vhl^{-/-REN}*-Tier vermindert ist. Nach Stimulation des RAAS finden sich im Kontrolltier in Folge von Rekrutierungsvorgängen erwartungsgemäß deutlich mehr reninbildende Zellen, als unter Normalbedingungen. Im *Vhl^{-/-REN}*-Tier hingegen ist die Zunahme an reninbildenden Zellen nur mäßig. Noch immer finden sich längst nicht in allen afferenten Arteriolen reninmarkierende Signale (Abb.3.4 und 3.5).

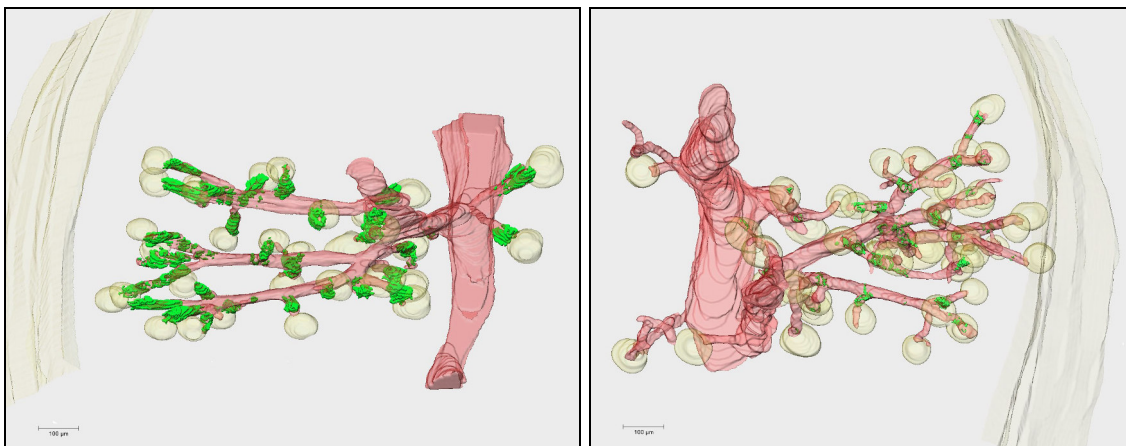


Abb. 3.4 3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten *Vhl^{fl/fl}*-Maus (links) und einer *Vhl^{-/-REN}*-Maus (rechts) nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Dargestellt sind die Gefäßwand in Rot, die reninbildenden Zellen in Grün und die Glomeruli sowie die Kapsel in Gelb. Die Skala gibt jeweils 100µm an.

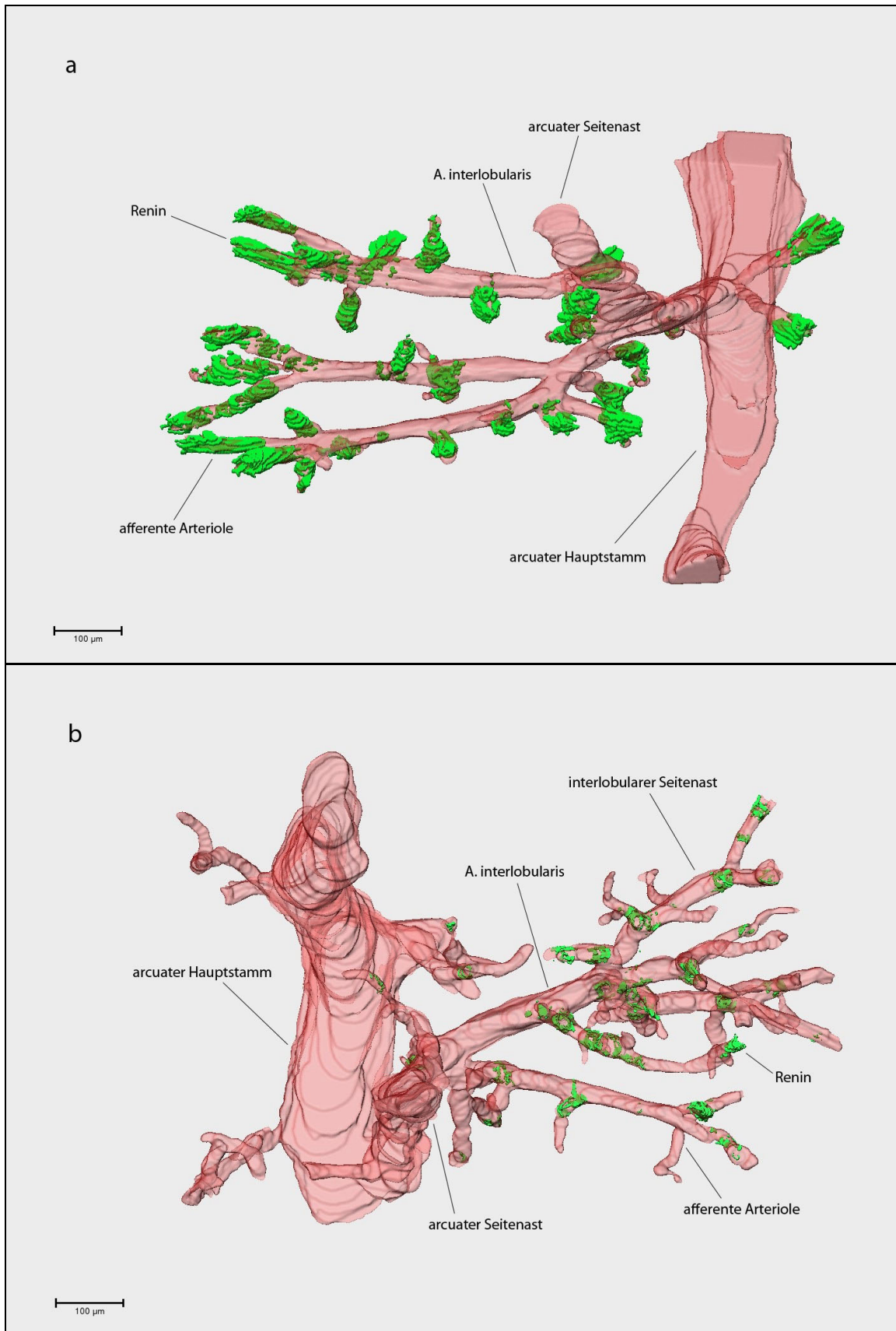


Abb. 3.5 3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten *Vhl^{fl/fl}*-Maus (a) und einer *Vhl^{-/-}-REN*-Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Dargestellt sind nur der Gefäßbaum (rot) und die reninbildenden Zellen (grün). Die Skala gibt jeweils 100μm an.

Berechnung des Reninvolumens anhand von 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen

Mit Hilfe des 3D-Rekonstruktionsprogramms Amira wurde anhand der Oberflächen, die bei den Rekonstruktionen erstellt worden waren, das Reninvolumen für die jeweiligen Bäume berechnet (Abb. 3.6). Die errechneten Volumina ermöglichen es, die Unterschiede zwischen den Gefäßbaumteilrekonstruktionen hinsichtlich der Anzahl reninbildender Zellen in den $Vhl^{fl/fl}$ - und $Vhl^{-/-REN}$ -Tieren zu quantifizieren. Definiert man das basale Volumen der reninbildenden Zellen im $Vhl^{fl/fl}$ -Kontrolltier als 100%, so erreicht das $Vhl^{-/-REN}$ -Tier basal nur ein Reninzellvolumen von 54% des Kontrolltiers. Nach Stimulation des RAAS durch Gabe einer Niedrigsalzdiät und Enalapril steigert sich das Reninvolumen im Kontrolltier auf 620% des basalen Wertes, wohingegen das $Vhl^{-/-REN}$ -Tier mit einem Volumenanteil von 97% gerade einmal das Reninvolumen des unstimulierten Kontrolltiers erreicht.

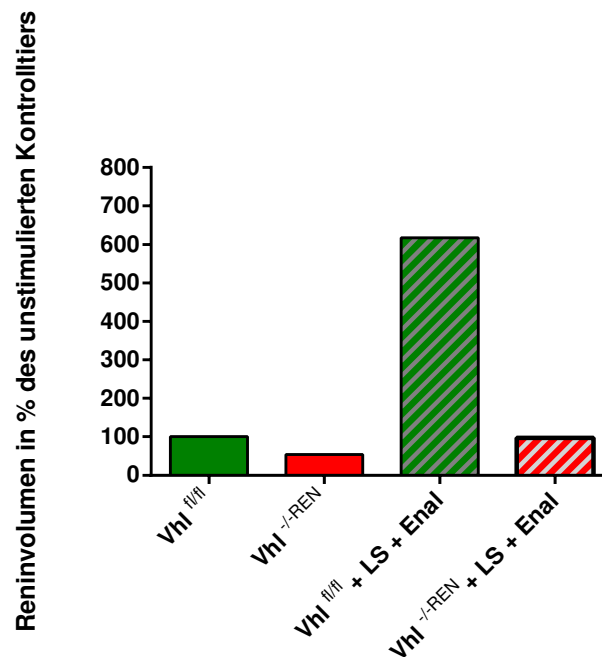


Abb. 3.6 Reninvolumen, angegeben in % des unstimulierten Kontrolltiers.

Die Berechnung der Reninvolumina erfolgte mittels der erstellten 3D-Rekonstruktionen. LS + Enal = Gabe einer Niedrigsalzdiät und des ACE-Hemmers Enalapril für 3 Wochen.

Histologische Analyse von Abundanz und Morphologie der reninbildenden Zellen

Bereits bei mikroskopischer Betrachtung der gegen Glattmuskelaktin und Renin gefärbten Gewebeschnitte können Unterschiede hinsichtlich der Anzahl reninbildender Zellen zwischen reninzellspezifischem Vhl-Knockout und Kontrolltier festgestellt werden. Repräsentative Übersichtsbilder in 100facher Vergrößerung zeigen, dass die Anzahl reninpositiver Zellen im Vhl^{-/-REN}-Tier im Vergleich zum Kontrolltier deutlich vermindert ist. Dies gilt sowohl unter Normalbedingungen als auch nach Stimulation des RAAS.

Auf Gewebeschnitten des unter Normalbedingungen aufgewachsenen Kontrolltiers markierte die Färbung an ca. jedem dritten Glomerulus Renin. Dies entspricht dem Bild, welches man bei entsprechenden Färbungen von Wildtypgewebe erhält. Auf Gewebeschnitten des Vhl^{-/-REN}-Tiers ist die Anzahl derjenigen Glomeruli, in deren Nähe reninmarkierende Signale gefunden werden, deutlich reduziert. Viele dieser Signale sind zudem atypisch lokalisiert, da sie sich nicht unmittelbar am vaskulären Pol befinden (Abb. 3.7 und Abb. 3.8). Wurde das RAAS der Tiere durch Gabe von Nidrigsalzfutter und Enalapril stimuliert, unterscheiden sich die Schnitte noch deutlicher in der Abundanz der reninmarkierenden Signale. Während Renin beim Kontrolltier reichlich am vaskulären Pol und in den afferenten Arteriolen zu finden ist, sind die Signale beim Knockout-Tier nach wie vor spärlich und wiederum atypisch lokalisiert (Abb. 3.9 und Abb. 3.10). Besonders deutlich wird dies jeweils bei ausschließlicher Darstellung des die Reninsignale wiedergebenden Farbkanals (Abb. 3.7 und Abb. 3.10).

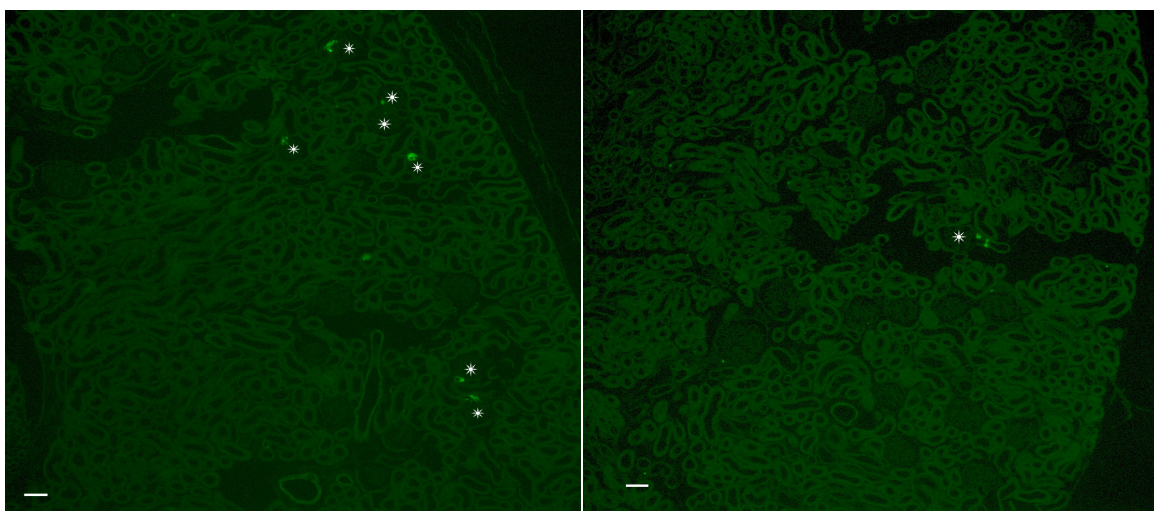


Abb. 3.7 Immunfluoreszenzfärbung von Renin an Paraffinschnitten einer Maus des Genotyps Vhl^{fl/fl} (links) und Vhl^{-/-REN} (rechts). Sternchen markieren Glomeruli mit Renin. Die Vergrößerung ist 100fach. Der Balken gibt jeweils 50 µm an.

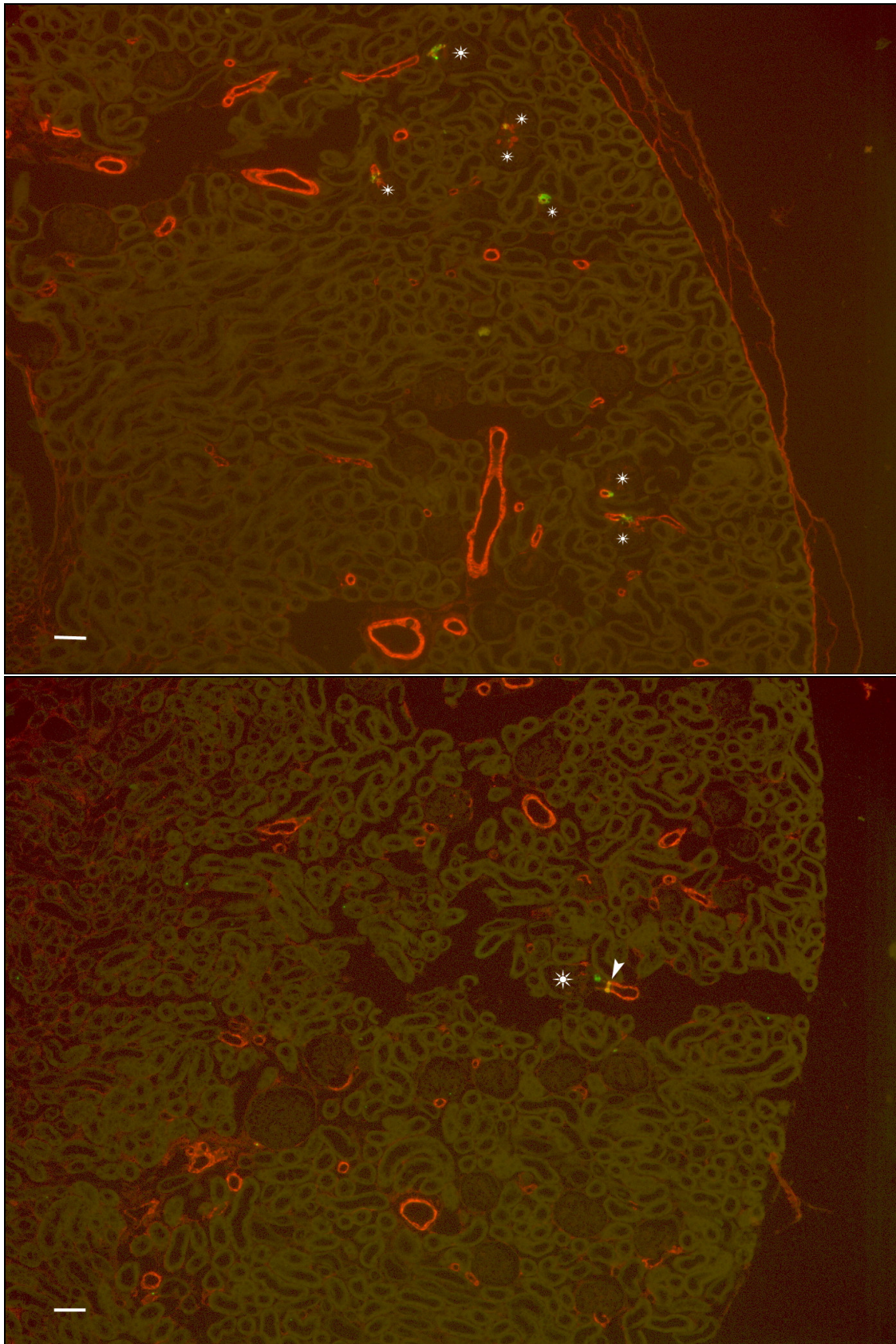


Abb. 3.8 Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten einer Maus des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ (oben) und $Vhl^{-/-REN}$ (unten). Dargestellt ist die Immunreaktion gegen Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün). Gelb zeigt eine Kolokalisation von Renin und Glattmuskelaktin. Sterne markieren Glomeruli mit Renin, Pfeile atypisch lokalisiertes Renin. Die Vergrößerung ist 100fach. Der Balken entspricht 50 μm .

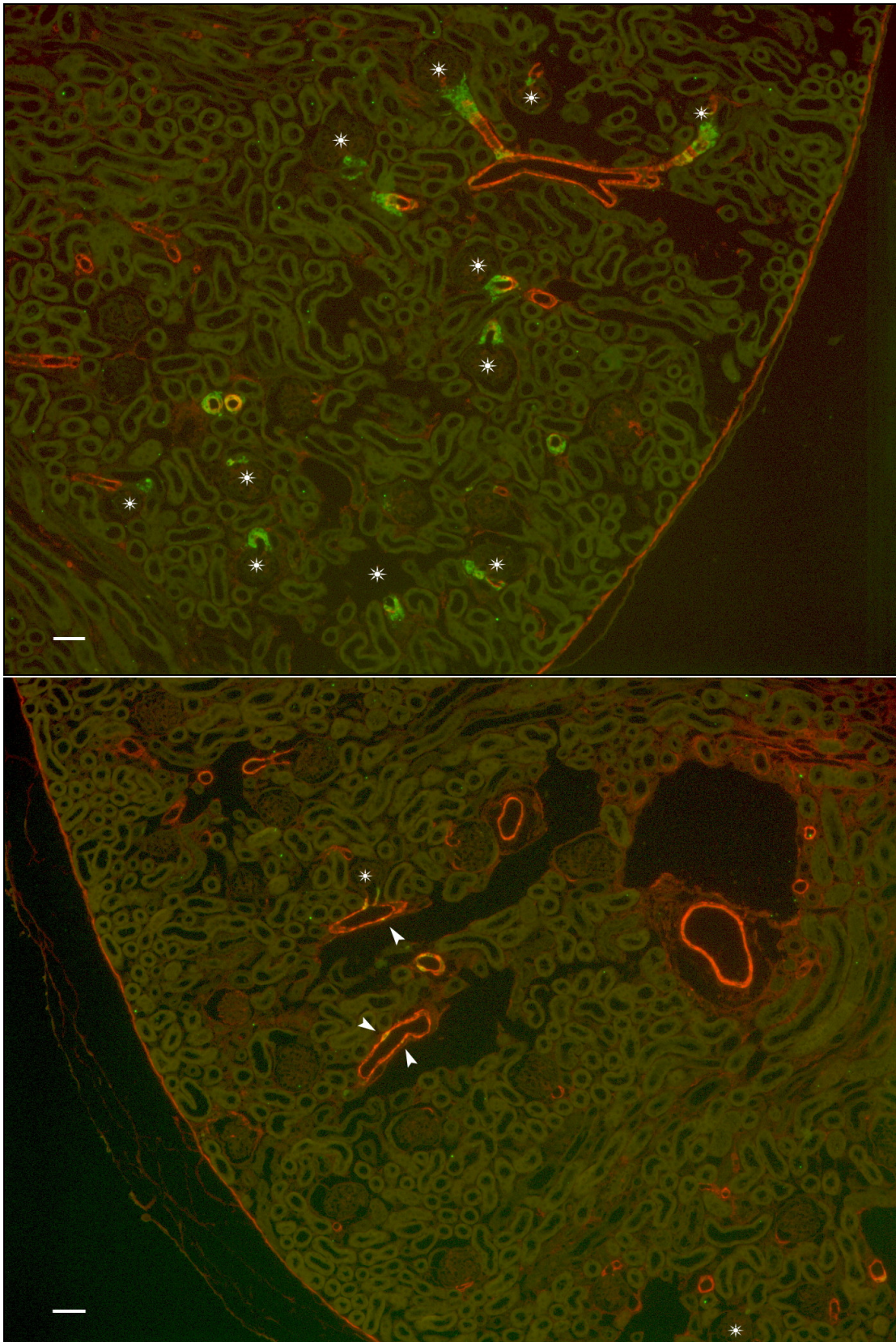


Abb. 3.9 Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten einer Maus des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ (oben) und $Vhl^{-/-REN}$ (unten) nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Dargestellt sind die Immunreaktionen gegen Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün). Gelb zeigt eine Kolokalisation von Renin und Glattmuskelaktin. Sterne markieren Glomeruli mit Renin, Pfeile atypisch lokalisierte Reninzellen. Die Vergrößerung ist 100fach. Der Balken entspricht 50 μm .

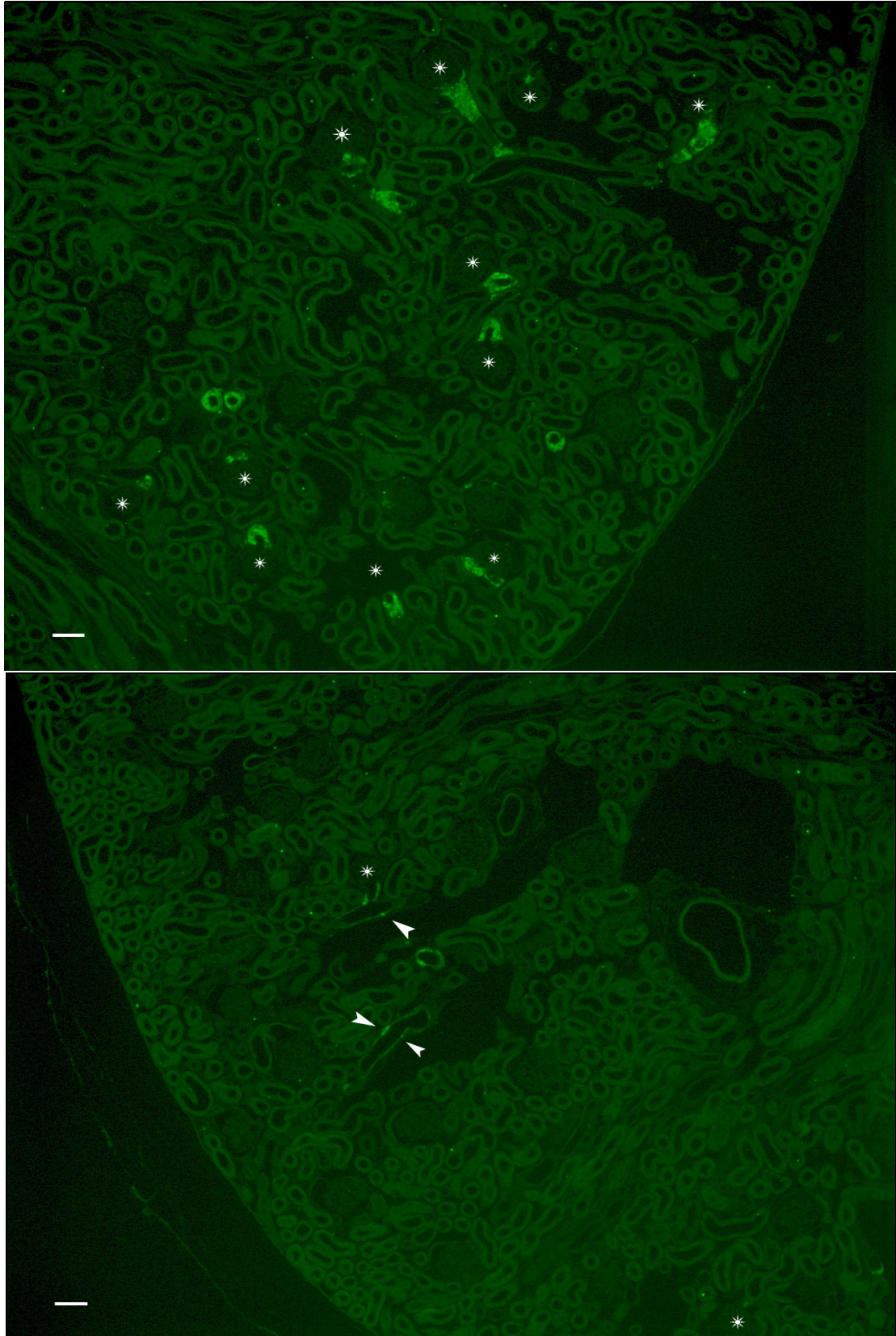


Abb. 3.10 Immunfluoreszenzfärbung von Renin an Paraffinschnitten einer Maus des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ (oben) und $Vhl^{fl/fl-REN}$ (unten). Sterne markieren Glomeruli mit Renin, Pfeile markieren atypisch lokalisierte Reninsignale. Die Vergrößerung ist 100fach. Der Balken gibt jeweils 50 μm an.

Auch hinsichtlich der Morphologie der reninbildenden Zellen fanden sich Unterschiede zwischen reninzellspezifischem Vhl-Knockout und Kontrolle. Unter Normalbedingungen wie auch nach Stimulation des RAAS erschienen die reninpositiven Zellen der $Vhl^{-/-REN}$ -Tiere deutlich schmaler und zarter. Besonders deutlich wird dies wiederum, wenn man den Aktinsignale wiedergebenden Farbkanal ausblendet und ausschließlich den Farbkanal betrachtet, der die Reninsignale abbildet (Abb. 3.11 und 3.12). Bei diesen schmalen, reninpositiven Zellen der $Vhl^{-/-REN}$ -Tiere schien zudem die Intensität der immunhistochemischen Färbung gegen Renin schwächer zu sein als bei den Kontrolltieren.

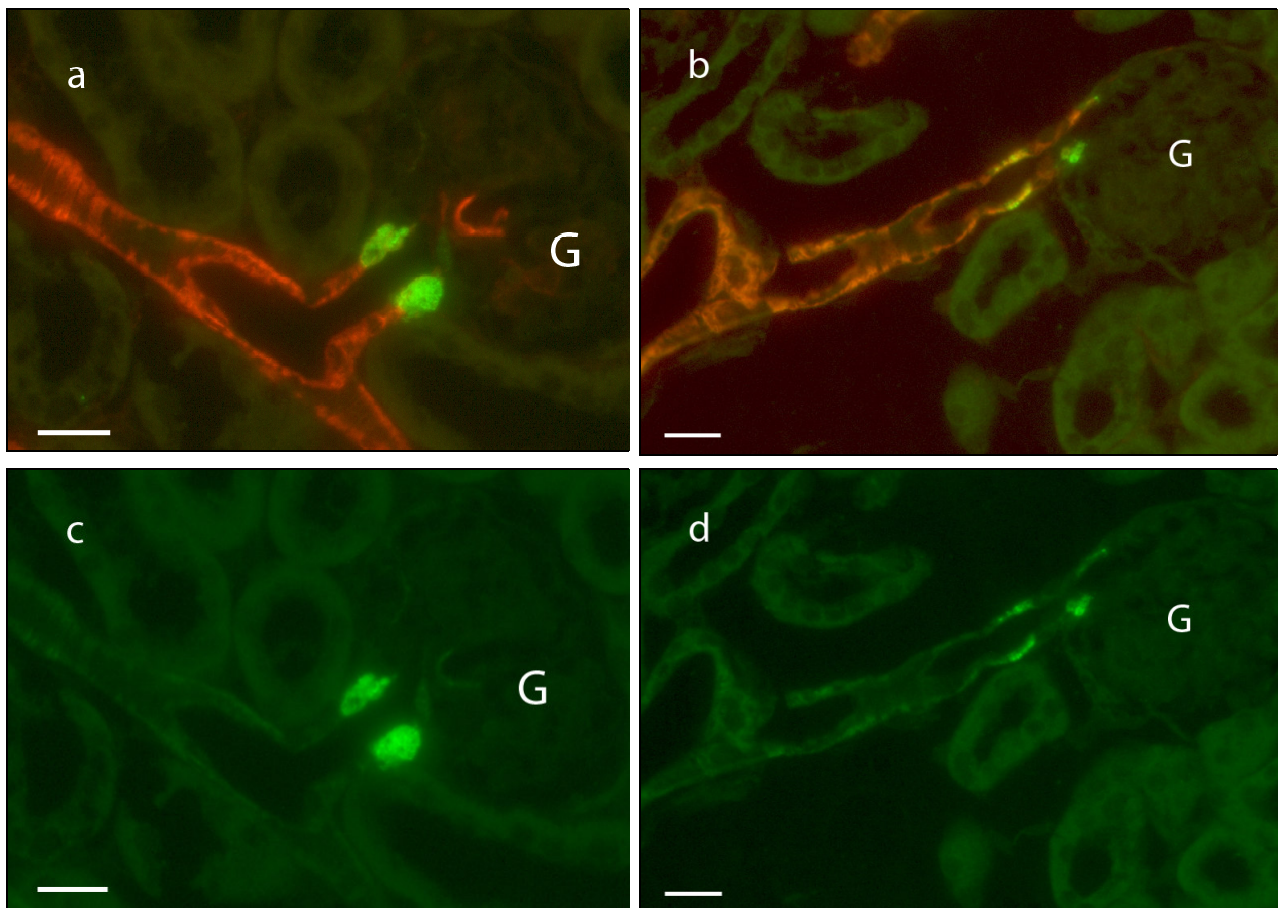


Abb. 3.11 Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten einer Maus des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ (a, c) und $Vhl^{-/-REN}$ (b, d)

- a), b): Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün). Gelb zeigt eine Kolo-kalisation von Glattmuskelaktin und Renin.
- c), d): alleinige Darstellung der reninmarkierenden Signale (grün).

G = Glomerulus; Die Vergrößerung ist 400-fach. Der Balken gibt jeweils 20µm an.

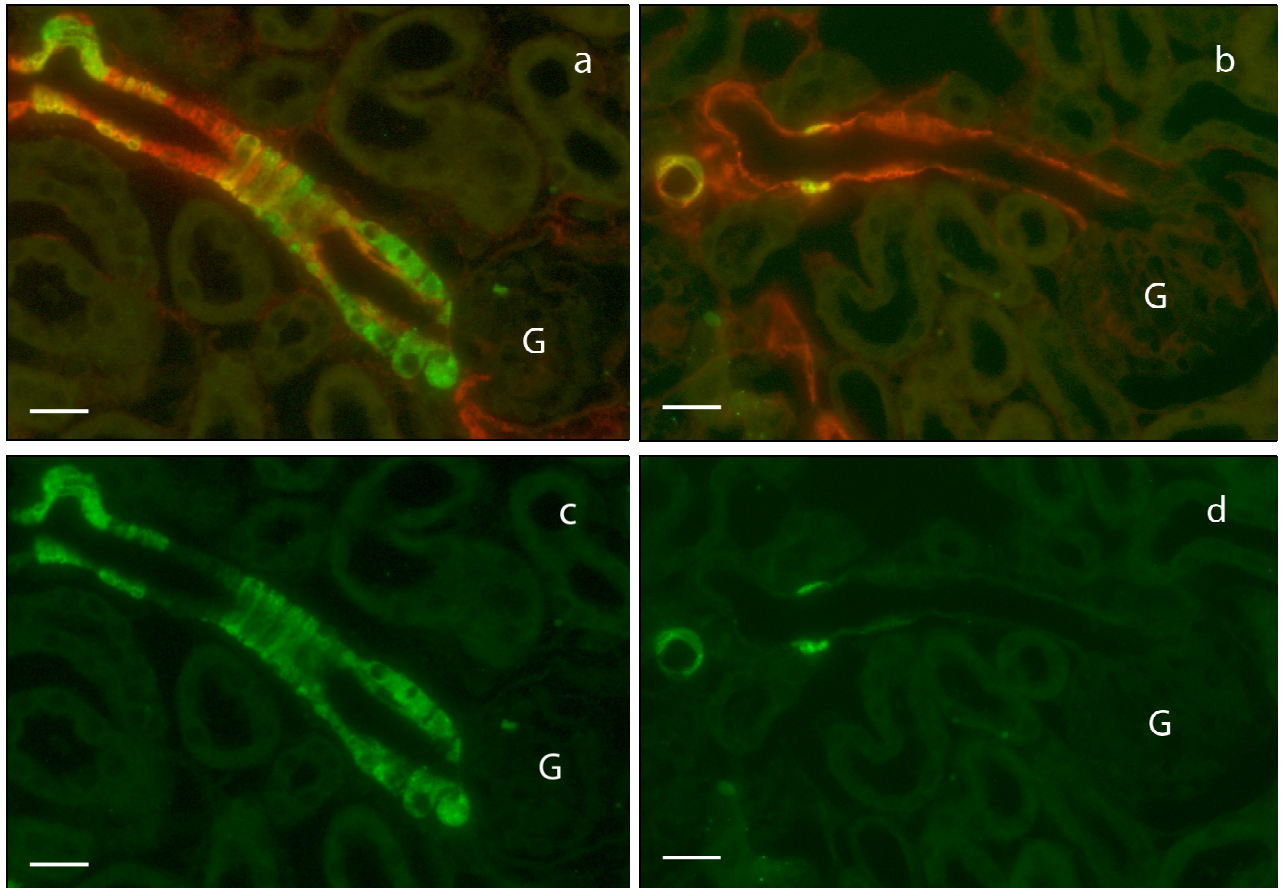


Abb. 3.12 Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten einer Maus des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ (a, c) und $Vhl^{-/-REN}$ (b, d) nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril.

- a), b): Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün). Gelb zeigt eine Kolokalisation von Glattmuskelaktin und Renin.
- c), d): alleinige Darstellung der reninmarkierenden Signale (grün).

G = Glomerulus; Die Vergrößerung ist 400-fach. Der Balken gibt jeweils 20µm an.

Hinsichtlich von Abundanz und Morphologie der reninbildenden Zellen in der reninzellspezifisch Vhl -defizienten Maus lässt sich somit festhalten, dass die Abundanz der reninpositiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle sowohl unter Normalbedingungen als auch nach Stimulation des RAAS deutlich vermindert ist. Zudem sind die reninbildenden Zellen der $Vhl^{-/-REN}$ -Tiere in ihrer Morphologie zarter. Dies scheint mit einer geringeren Reninexpression in den Knockout-Tieren einherzugehen. Anlass zu dieser Vermutung geben die Ergebnisse der Untersuchungen zum Reninvolumen sowie die Tatsache, dass bei vielen reninpositiven Zellen der Knockout-Tiere die Intensität der immunhistochemischen Färbung gegen Renin ungewöhnlich schwach war.

3.1.2. Lokalisation reninbildender Zellen in der reninzellspezifisch Vhl-defizienten Maus

Analyse der Lokalisation reninbildender Zellen in der reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Maus anhand erstellter 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen

Bei den Vhl^{-/-REN}-Tieren fiel auf, dass die Lokalisation der reninbildenden Zellen, anders als bei den Kontrolltieren, nicht immer dem typischen juxtaglomerulären Muster folgte. Daher wurde in dieser Arbeit eine detaillierte Analyse der Lokalisation reninbildender Zellen in der reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Maus durchgeführt. Dies geschah anhand der erstellten 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen.

Bereits bei den Tieren, welche unter Normalbedingungen aufgewachsen sind, können Unterschiede in der Verteilung reninbildender Zellen zwischen den beiden Genotypen Vhl^{fl/fl} und Vhl^{-/-REN} festgestellt werden.

Das Kontrolltier zeigt das klassische Verteilungsmuster reninpositiver Zellen, welches auch in Wildtyptieren gefunden wird: An fast jedem vaskulären Pol finden sich reninbildende Zellen. Weist ein Glomerulus keine reninpositiven Zellen in juxtaglomerulärer Position auf, finden sich auch weiter proximal im Gefäßbaum – also distal vom Glomerulus – keine reninpositiven Signale. Proximal der afferenten Arteriole werden im Gefäßbaum keine reninpositiven Zellen gefunden (Abb. 3.13, Abb. 3.14 und Abb.3.15).

Beim reninzellspezifischen Vhl-Knockout sticht hervor, dass bei einem bedeutenden Teil der Glomeruli keine reninmarkierenden Signale am vaskulären Pol gefunden werden. In der erstellten Gefäßbaumteilrekonstruktion findet sich für rund 50% der Glomeruli keine direkte Beziehung zu reninbildenden Zellen. Das bedeutet, bei diesen Glomeruli finden sich reninpositive Zellen weder am vaskulären Pol, noch in der afferenten Arteriole und auch in keinem anderen, weiter proximal im Gefäßbaum gelegenen Gefäß, welches an der direkten Blutzufuhr des jeweiligen Glomerulus beteiligt ist (Abb. 3.13 und 3.14). Zudem weicht für einen Teil der Glomeruli, welche mit reninbildenden Zellen

assoziiieren, die Lokalisation der reninpositiven Zellen vom typischen, juxtaglomerulären Verteilungsmuster ab: Anstatt in juxtaglomerulärer Position, finden sich reninbildende Zellen in Distanz zum vaskulären Pol in einem beliebigen Abschnitt der afferenten Arteriole oder im Bereich der Gabelung, welcher die afferente Arteriole entspringt (Abb. 3.15). In der angefertigten Gefäßbaumteilrekonstruktion beträgt der Anteil solcher Glomeruli, für welche lediglich atypisch lokalisierte reninbildende Zellen gefunden wurden, rund 4%.

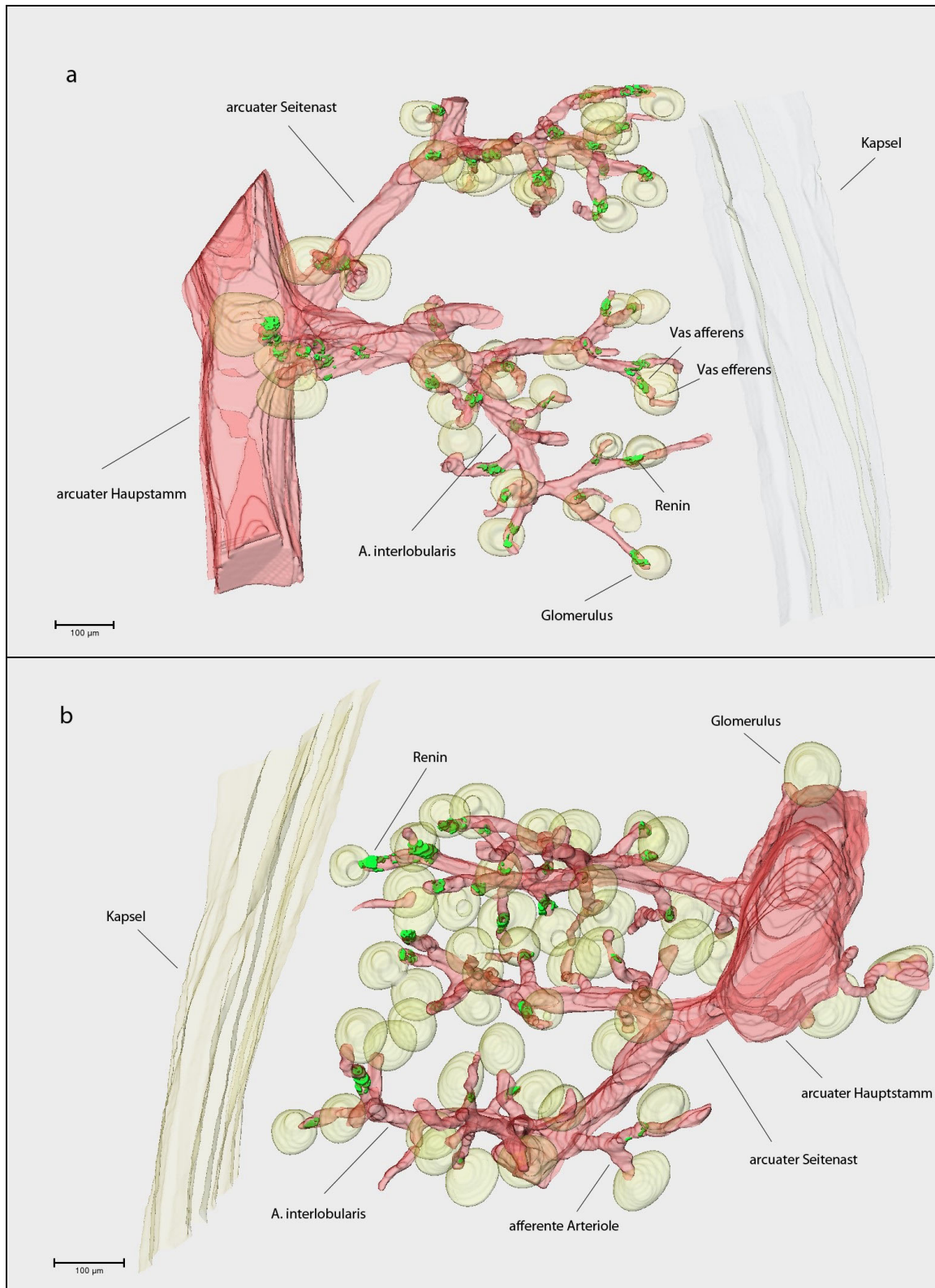


Abb. 3.13 3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b). Dargestellt ist die Gefäßwand in Rot, die reninbildenden Zellen in Grün und die Glomeruli sowie die Kapsel in Gelb. Die Skala gibt jeweils 100 μm an.

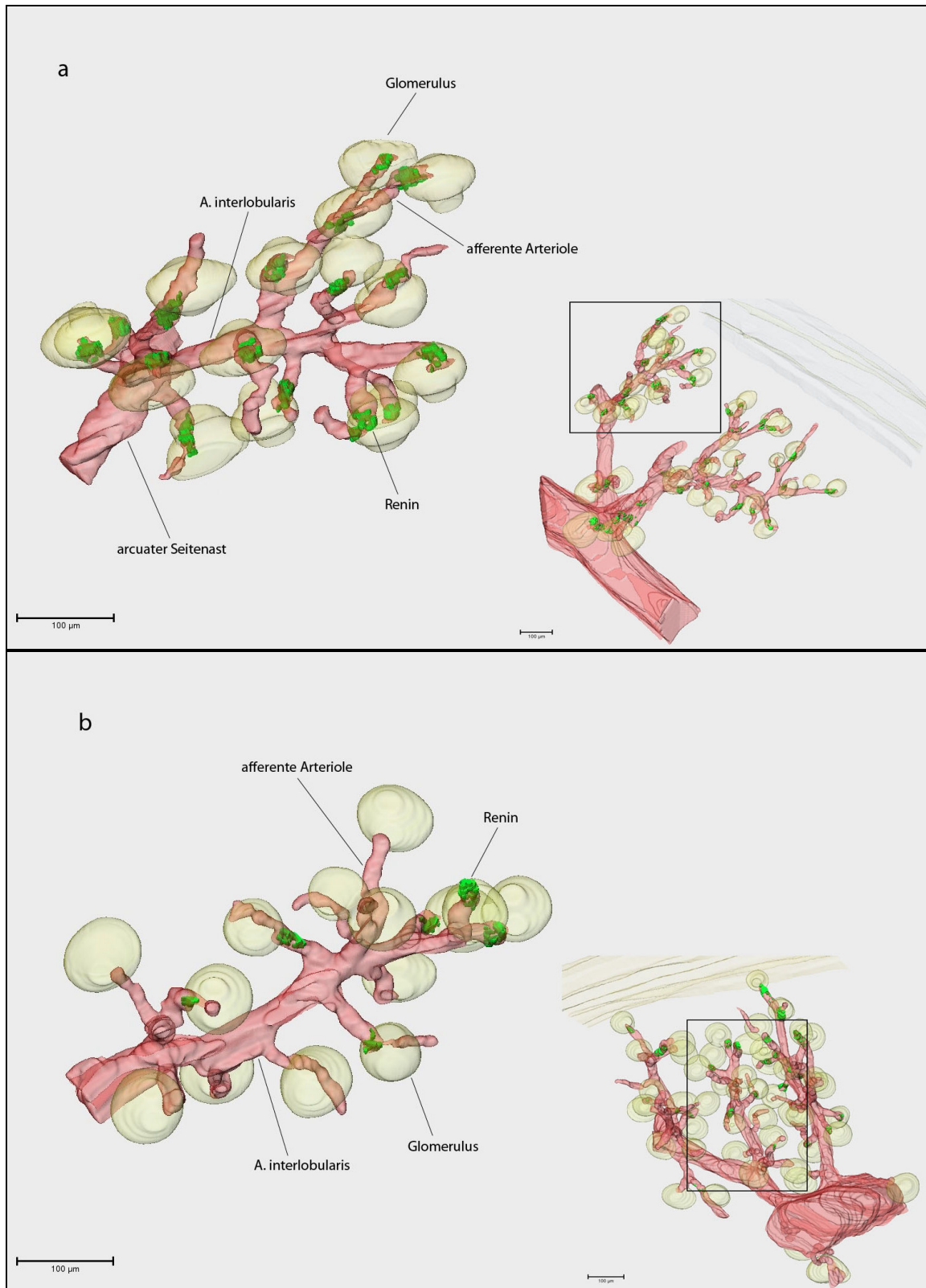


Abb. 3.14 A. interlobularis einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) – Ausschnitte aus den in Abb. 3.13 gezeigten Bäumen. Die in der rechten unteren Ecke eingefügte Graphik markiert den Bereich der Rekonstruktion der vergrößert dargestellt wird. Die Skala gibt jeweils 100µm an.

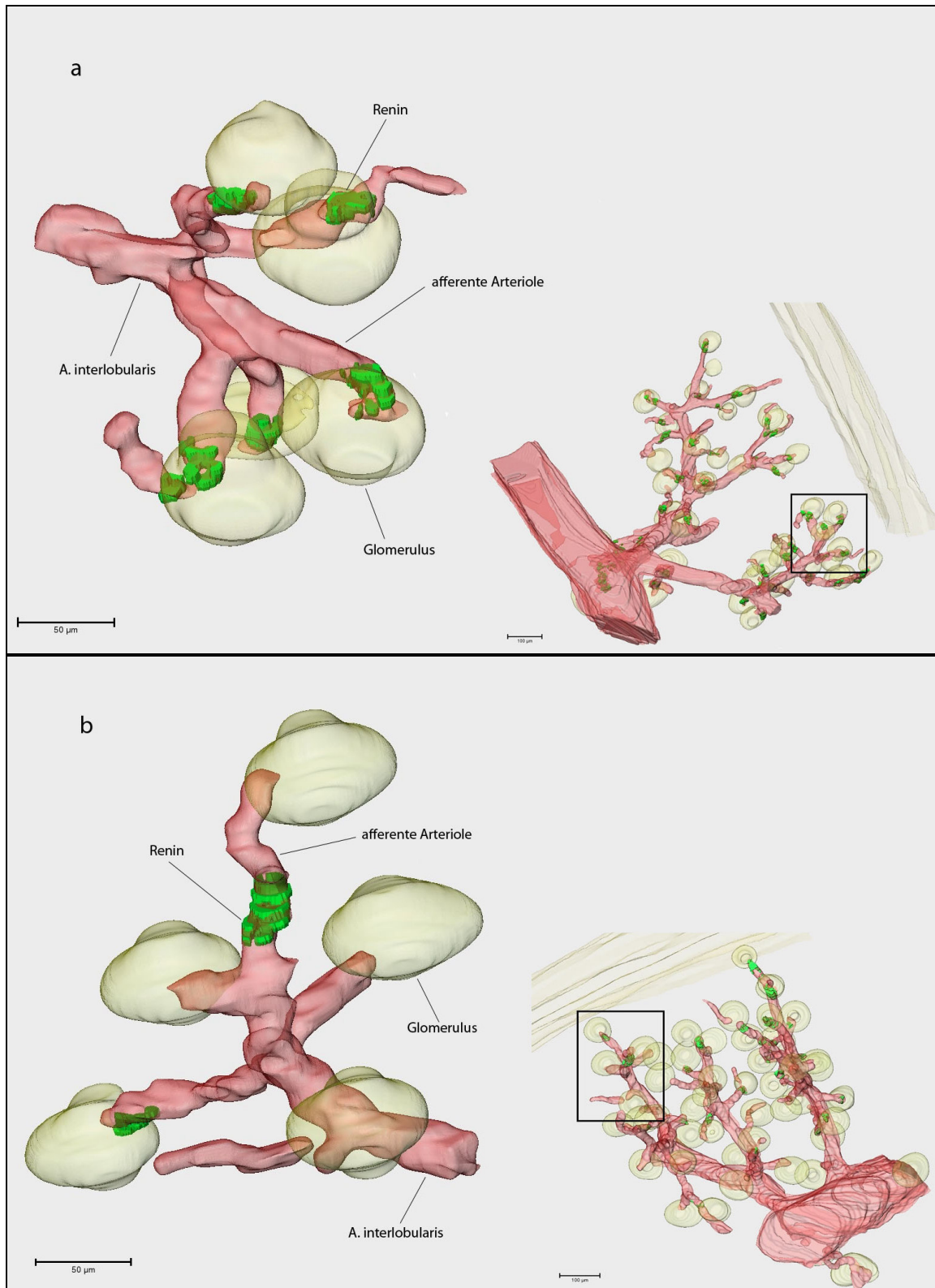


Abb. 3.15 Terminales Ende einer A. interlobularis einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) – Ausschnitte aus den in Abb. 3.13 gezeigten Bäumen.

Die in der rechten unteren Ecke eingefügte Graphik markiert den Bereich der Rekonstruktion, der vergrößert dargestellt wird.

Die Skalen geben für die Vergrößerungen 50 μm , für die Orientierungsgraphiken 100 μm an.

Nach Stimulation des RAAS durch Gabe von Niedrigsalzfutter und Enalapril wird der Unterschied in der Verteilung der reninbildenden Zellen zwischen Knockout und Kontrolle noch deutlicher.

Die Rekonstruktion der Niere des Kontrolltiers zeigt die klassische Verteilung reninbildender Zellen im Rahmen des Phänomens der Rekrutierung, welche bei Wildtyptieren nach einer derartigen Stimulation des RAAS in gleicher Weise gefunden wird:

Alle Glomeruli weisen reninpositive Zellen in juxtaglomerulärer Position auf. Bei keinem Glomerulus limitiert sich das Vorkommen reninbildender Zellen auf den vaskulären Pol. Bei ca. 55% der Glomeruli beschränken sich die reninbildenden Zellen in ihrem Auftreten auf die afferente Arteriole, bei den übrigen Glomeruli finden sich auch in zuführenden Gefäßen, welche proximal der afferenten Arteriole im Gefäßbaum liegen, reninpositive Zellen (Abb. 3.16, Abb. 3.17 und Abb. 3.18).

In den Gefäßwänden des $Vhl^{-/-REN}$ -Tiers sind auch nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril Anzahl und Dichte der reninpositiven Zellen deutlich niedriger als im Kontrollgeschwistertier (Abb. 3.16).

In der angefertigten Gefäßbaumteilrekonstruktion können für rund 10% der Glomeruli in keinem den Glomerulus direkt versorgenden Abschnitt des Gefäßbaums reninpositive Zellen gefunden werden, also weder am vaskulären Pol, noch in der afferenten Arteriole, noch in der zuführenden A. interlobularis oder in einem proximal der A. interlobularis gelegenen, an der direkten Versorgung des Glomerulus beteiligten Abschnitt des Gefäßbaums. Eine Übersicht über Aufbau und Nomenklatur des renalen Gefäßbaums der Maus gibt Abb. 3.29b, sie findet sich am Ende dieses Kapitels.

Weitere gute 50% der Glomeruli weisen zwar keine reninbildenden Zellen in der typischen juxtaglomerulären Position auf, jedoch finden sich an anderer Stelle im Verlauf ihrer Zuflussbahn im Nierengefäßbaum reninpositive Zellen (Abb. 3.17 und 3.18). Bei rund 75% dieser Glomeruli bleibt die afferente Arteriole gänzlich frei von reninbildenden Zellen und reninpositive Zellen erscheinen - vom Glomerulus aus gesehen - zum ersten Mal in der zuführenden A. interlobularis.

Somit finden sich im $Vhl^{-/-REN}$ -Tier auch nach Stimulation des RAAS in knapp 50% aller afferenten Arteriolen keine reninpositiven Zellen.

Bei knapp 40% der Glomeruli der Rekonstruktion finden sich reninbildende Zellen am vaskulären Pol. Bei den allermeisten dieser Glomeruli finden sich reninpositive Zellen nicht nur in juxtaglomerulärer Position, sondern auch an anderer Stelle im Gefäßbaum. Sie treten über die afferente Arteriole verteilt auf oder auch in proximal der afferenten Arteriole gelegenen Abschnitten des Gefäßbaums, die an der direkten Blutversorgung des Glomerulus beteiligt sind. Dies ist Ausdruck von Rekrutierungsvorgängen in Reaktion auf die Stimulation des RAAS.

Auffällig ist bei der Gefäßbaumteilrekonstruktion des $Vhl^{-/-REN}$ -Tiers nach Stimulation des RAAS zudem die häufige Lokalisation reninpositiver Zellen im Bereich von Gefäßabgängen und Gefäßgabelungen (Abb. 3.17 und Abb. 3.18). Als Gefäßabgang wird hier der Bereich eines Gefäßes bezeichnet, der sich unmittelbar an eine Gabelung anschließt.

Eine Übersicht über die genauen Lageverhältnisse und Prozentangaben geben Abb. 3.19 und Tab. 3.1.

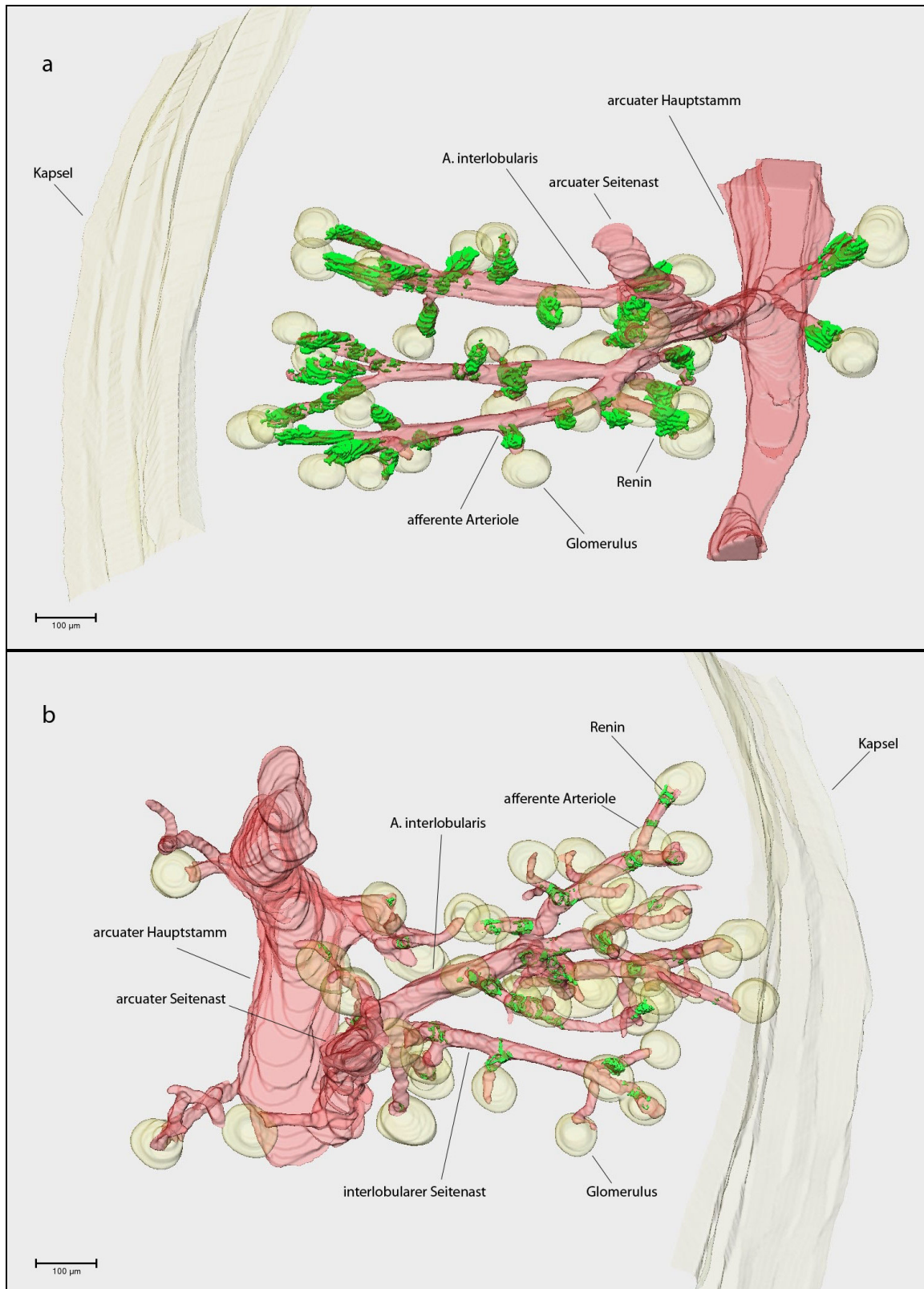


Abb. 3.16 3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Dargestellt sind die Gefäßwand in Rot, die reninbildenden Zellen in Grün und die Glomeruli sowie die Kapsel in Gelb. Die Skala gibt jeweils 100 μm an.

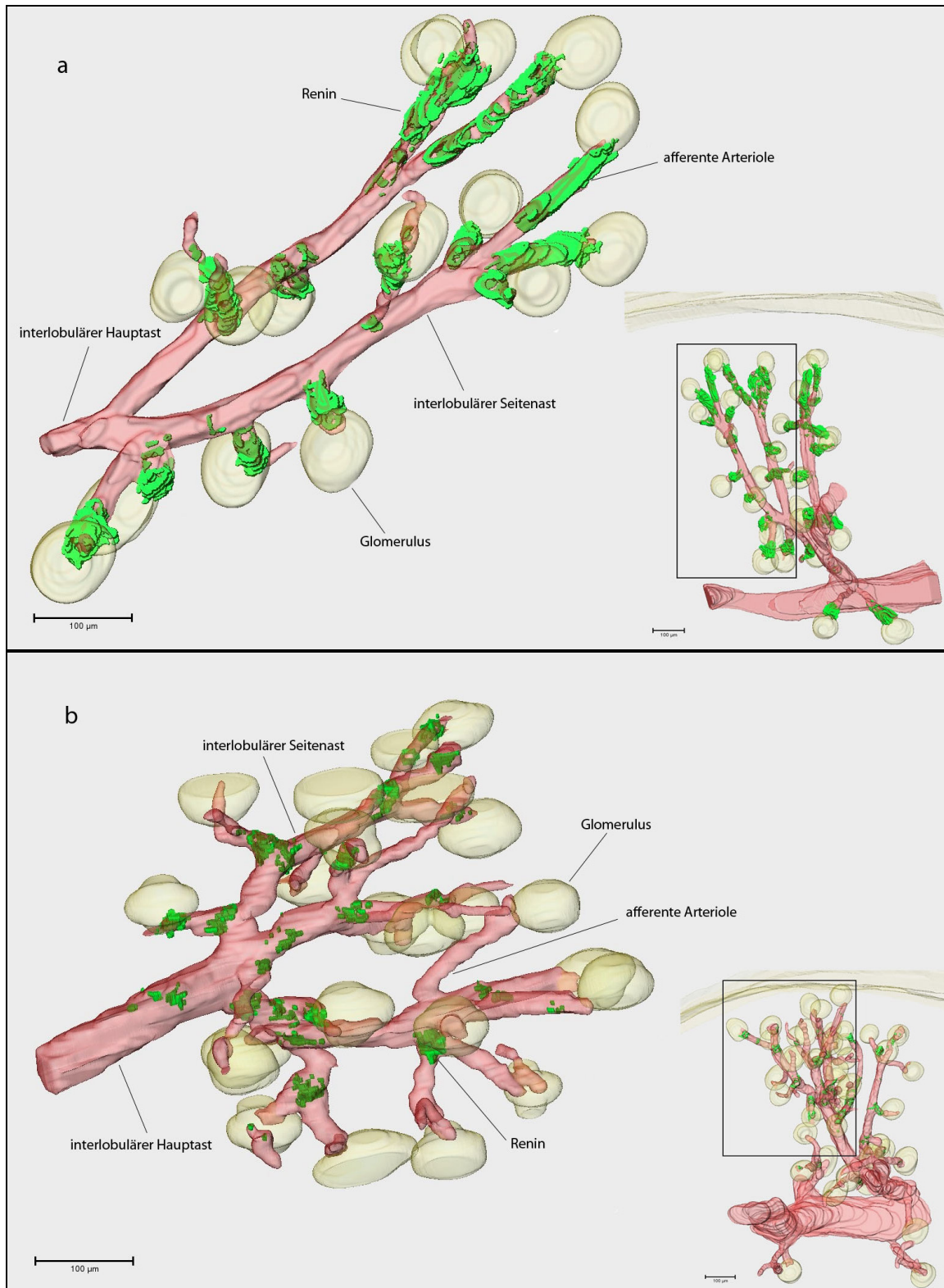


Abb. 3.17 Interlobulärer Hauptast einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril – Ausschnitte aus den in Abb. 3.16 gezeigten Rekonstruktionen. In Abb. 3.17b erkennt man Reninsignale im interlobulären Hauptast, hier wurde aus Übersichtlichkeitsgründen auf dessen rechter Seite der Abgang eines interlobulären Seitenastes in der Vergrößerung ausgeblendet. Die in der rechten unteren Ecke eingefügte Graphik markiert jeweils den Ausschnitt, der vergrößert dargestellt wird. Farben wie in Abb. 3.16. Die Skala gibt jeweils 100µm an.

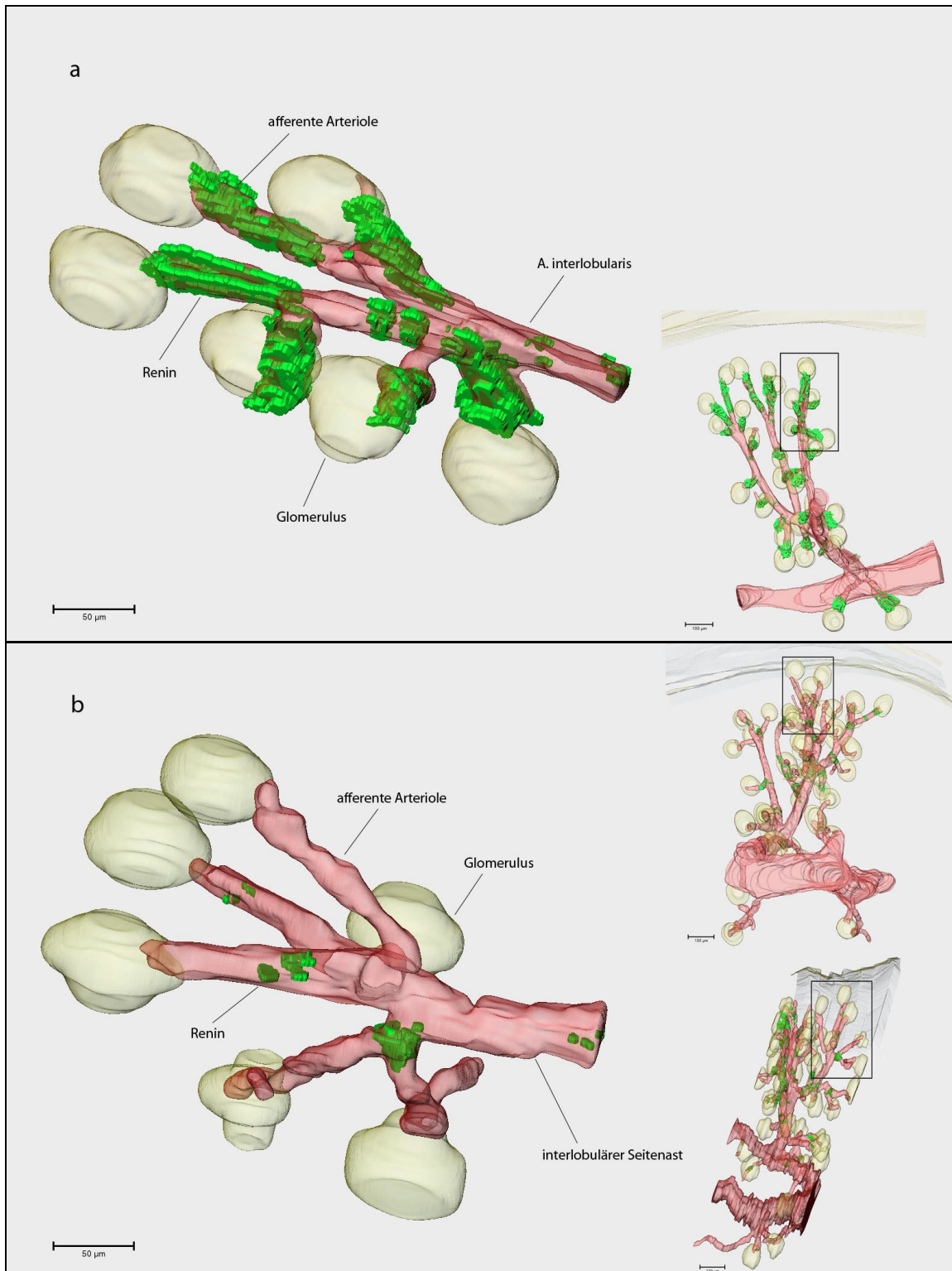


Abb. 3.18 Terminales Ende eines interlobulären Seitenastes einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril – Ausschnitte aus den in Abb. 3.16 gezeigten Rekonstruktionen. Die kleinen, rechts eingefügten Graphiken zeigen jeweils, welcher Teil der Rekonstruktion vergrößert wurde. Farben wie in Abb. 3.16. Die Skala gibt für die Vergrößerungen 50 μm , für die Orientierungsgraphiken 100 μm an.

Abbildung 3.19 veranschaulicht die Lagebeziehung zwischen Glomeruli und reninbildenden Zellen für die jeweiligen Genotypen. Beachtenswert ist, dass beim $Vhl^{-/-REN}$ -Tier unter Normalbedingungen nur für gut 50% der Glomeruli reninpositive Zellen an irgendeiner Stelle der sie direkt versorgenden Blutbahn im Nierengefäßbaum gefunden wurden. Nicht alle dieser Glomeruli wiesen reninbildende Zellen am vaskulären Pol auf. Nach Stimulation des RAAS fanden sich für die Mehrzahl der Glomeruli im $Vhl^{-/-REN}$ -Tier reninpositive Zellen in der sie direkt versorgenden Gefäßbahn, jedoch besetzten diese reninbildenden Zellen bei weniger als 40% der Glomeruli die juxtaglomeruläre Position. Bei den Kontrolltieren zeigte sich sowohl unter Normalbedingungen als auch nach Stimulation des RAAS das klassische, für Wildtyptiere typische Bild. Es fanden sich für nahezu 100% der Glomeruli reninpositive Zellen am vaskulären Pol.

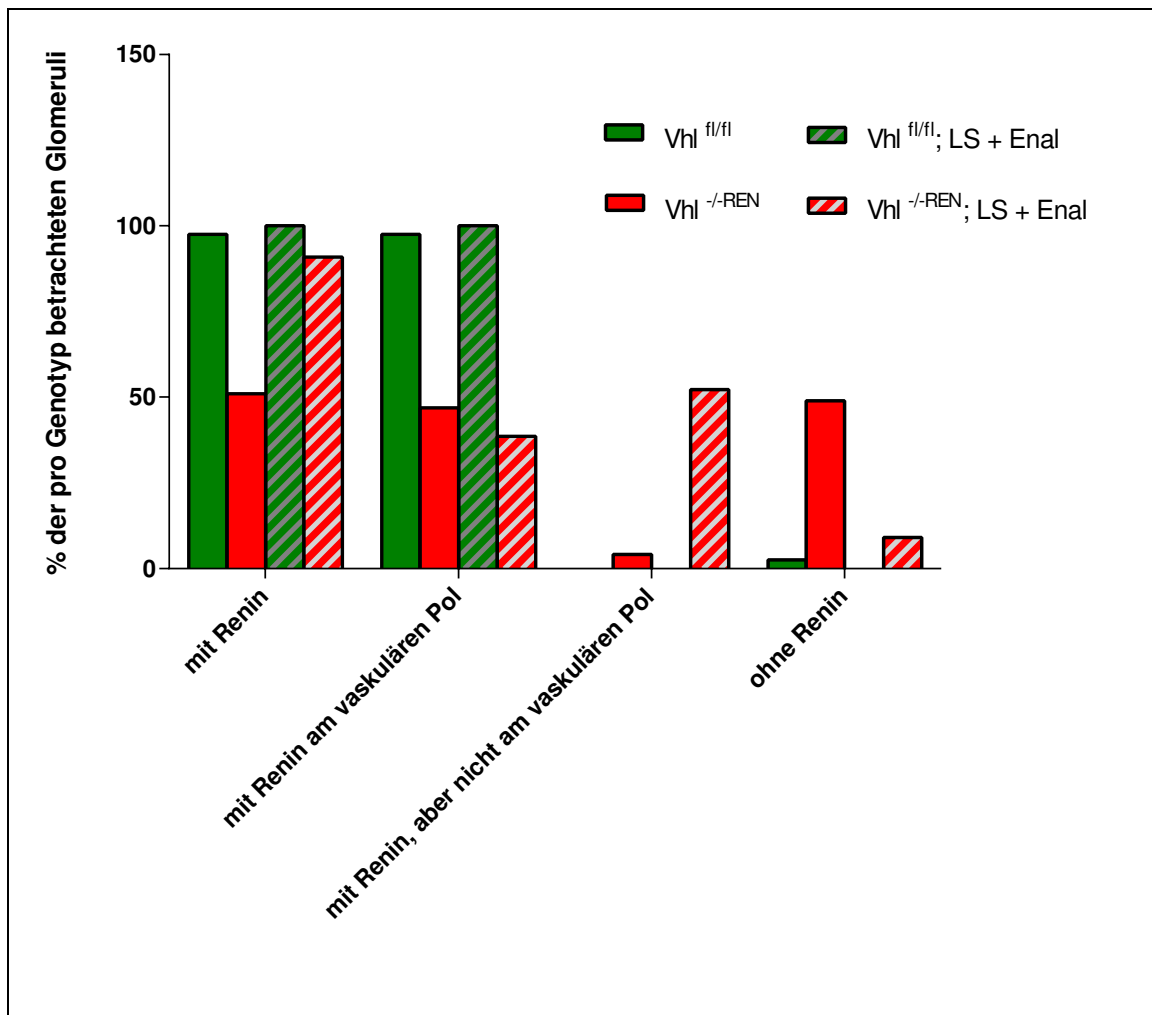


Abb. 3.19 Lagebeziehung zwischen Glomeruli und reninpositiven Zellen ermittelt aus 3D-Gefäßbaum-teilrekonstruktionen der jeweiligen Genotypen. Gezeigt wird das Auftreten verschiedener Lagebeziehungen zwischen Glomeruli und reninbildenden Zellen in % der Gesamtzahl der zu diesem Genotyp untersuchten Glomeruli. Pro Genotyp wurde eine Teilrekonstruktion analysiert.

LS + Enal = Fütterung einer Nidrigsalzdiät und Gabe des ACE-Hemmers Enalapril für 3 Wochen.

Der Übersicht halber erfolgt an dieser Stelle der Einschub einer Tabelle, welche eine orientierende Übersicht über die Lagebeziehungen zwischen Glomeruli und reninpositiven Zellen für die jeweiligen Genotypen gibt. Die Daten stammen aus den Analysen der 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen.

Die genaue Lagebeziehung zwischen Glomeruli und reninpositiven Zellen bei den jeweiligen Genotypen wird am Ende dieses Kapitels ausführlich behandelt. Dort finden sich noch detailliertere Tabellen.

Lokalisation reninbildender Zellen im Gefäßbaum jeweils in Bezug auf die Glomeruli	Kt-basal	KO-basal	Kt-stim	KO-stim
Glomeruli gesamt	100,00% (40)	100,00% (49)	100,00% (31)	100,00% (44)
Glomeruli mit Renin	97,50% (39)	51,02% (25)	100,00% (31)	90,91% (40)
Glomeruli mit Renin am vaskulären Pol	97,50% (39)	46,94% (23)	100,00% (31)	38,64% (17)
Glomeruli mit Renin, aber nicht am vaskulären Pol		4,08% (2)		52,27% (23)
Glomeruli ohne Renin	2,50% (1)	48,98% (24)		9,09% (4)
Glomeruli mit Renin am vaskulären Pol	97,50% (39)	46,94% (23)	100,00% (31)	38,64% (17)
<u>Renin nur direkt am vaskulären Pol</u>	<u>38,46% (15)</u>	<u>26,53% (13)</u>		<u>2,27% (1)</u>
<u>Renin direkt am vaskulären Pol und weiter proximal im Gefäßbaum</u>	<u>60,00% (24)</u>	<u>20,41% (10)</u>	<u>100,00% (31)</u>	<u>36,36% (16)</u>
Renin am vaskulären Pol und in der afferenten Arteriole	60,00% (24)	18,37% (9)	54,84% (17)	
Renin am vaskulären Pol, in der afferenten Arteriole und weiter proximal		2,04% (1)		25,00% (11)
Renin am vaskulären Pol, in afferenter Arteriole und im Bereich Abgang/Gabelung A. afferens/A. interlobularis			22,58% (7)	
Renin am vask. Pol, in afferenter Arteriole und im Bereich Abgang/Gabelung A. afferens/A. interlobularis und prox. davon			22,58% (7)	
Renin am vask. Pol, dann erst wieder in A. interlobularis, jedoch mit Bezug zum Abgang des Vas afferens des Glomerulus				4,55% (2)
Renin am vaskulären Pol und dann erst wieder weit proximal im Gefäßbaum				6,82% (3)
Glomeruli mit Renin, aber nicht am vaskulären Pol		4,08% (2)		52,27% (23)
Renin erscheint zum ersten Mal in der afferenten Arteriole		2,04% (1)		13,64% (6)
Renin erscheint zum ersten Mal in der afferenten Arteriole und im Abgang der afferenten Arteriole		2,04% (1)		
Renin erscheint zum ersten Mal in A. interlobularis in der Nähe zum Abgang der afferenten Arteriole				22,73% (10)
Renin erscheint zum ersten Mal in A. interlobularis, aber unabhängig vom Vas afferens des Glomerulus				15,91% (7)

Tabelle 3.1 Übersicht über die Lokalisation der reninbildenden Zellen in den betrachteten Gefäßbaumteilrekonstruktionen jeweils in Bezug auf die Glomeruli. Angaben in Prozent der in der jeweiligen Rekonstruktion betrachteten Glomeruli. Der absolute Zahlenwert ist in Klammern angegeben. Kt-basal = $Vhl^{fl/fl}$ aufgewachsen unter Normalbedingungen, KO-basal = $Vhl^{-/-REN}$ aufgewachsen unter Normalbedingungen, Kt-stimuliert = $Vhl^{fl/fl}$ nach Stimulation des RAAS, KO stim = $Vhl^{-/-REN}$ nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril über einen Zeitraum von 3 Wochen

Histologische Analyse der Lokalisation reninbildender Zellen im reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Tier

Die unterschiedliche Lokalisation reninbildender Zellen in $Vhl^{-/-REN}$ -Tier und Kontrolle ist bereits auf repräsentativen gegen Glattmuskelaktin und Renin immunfluoreszenz-gefärbten Gewebeschnitten gut erkennbar.

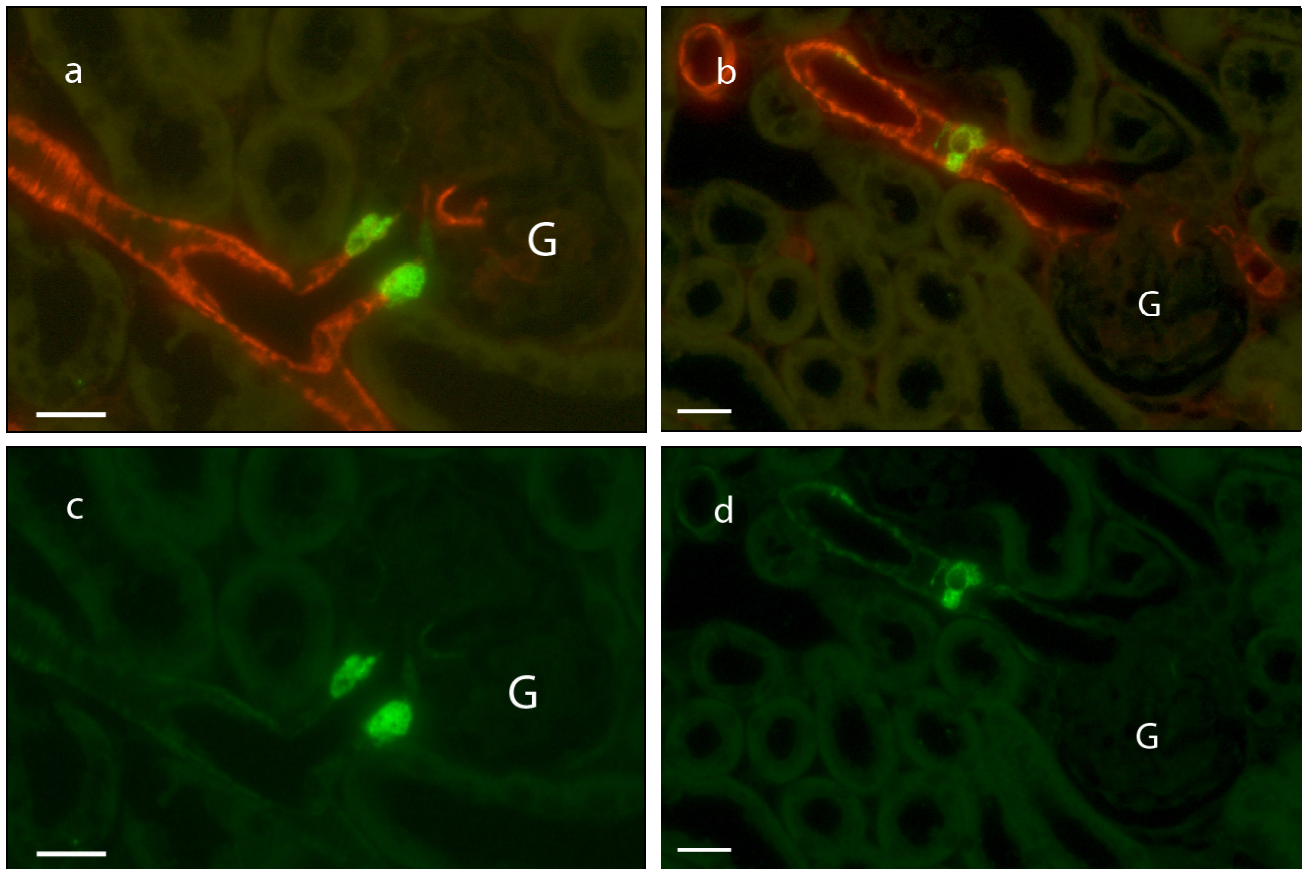


Abb. 3.20 Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a, c) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b, d).

- a), b): Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün). Gelb zeigt eine Kolokalisation von Glattmuskelaktin und Renin.
- b), d): Alleinige Darstellung der reninmarkierenden Signale.

G = Glomerulus; Die Vergrößerung ist 400-fach. Der Balken gibt jeweils 20µm an.

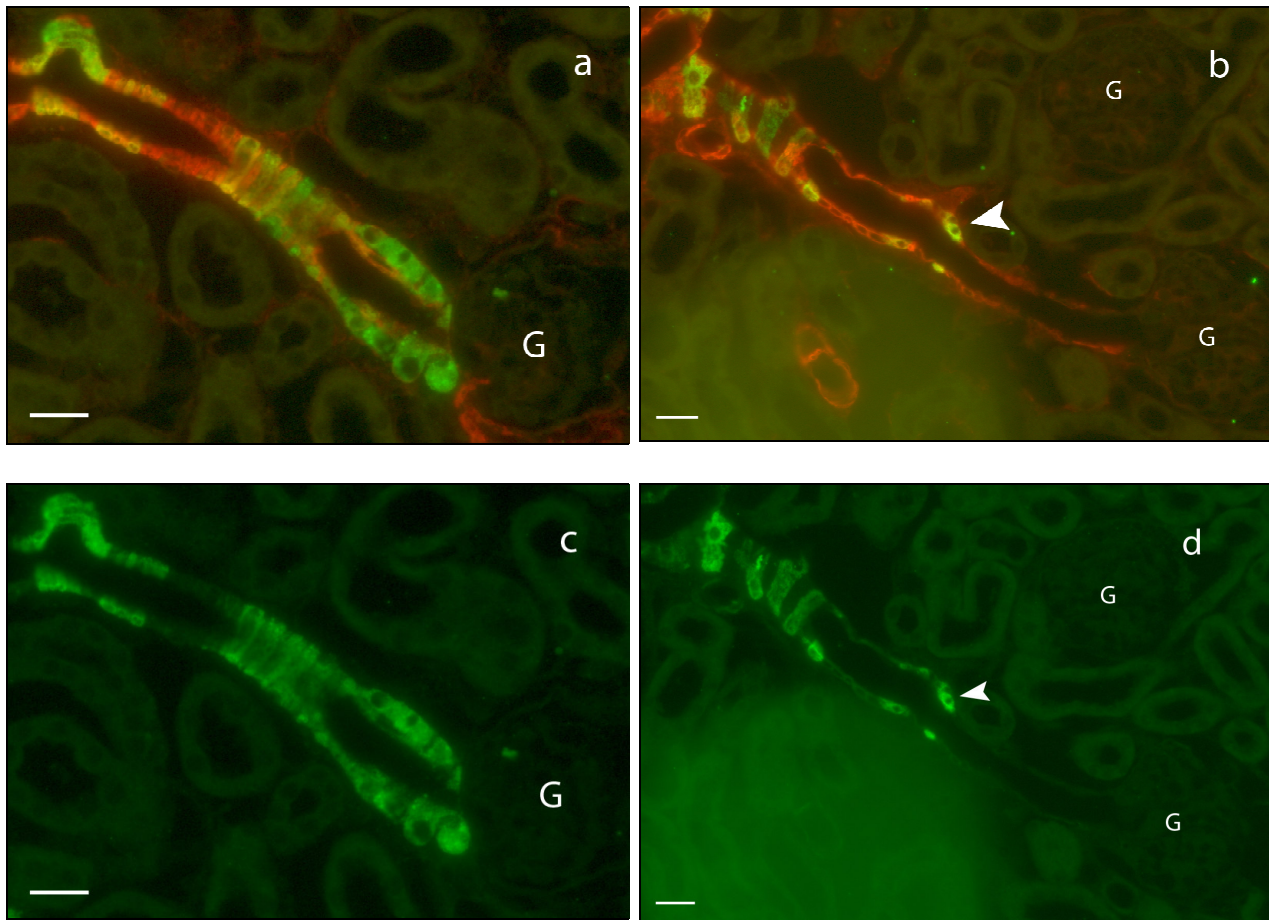


Abb. 3.21 Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a, c) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b, d) nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril.

- a), b): Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün). Gelb zeigt eine Kolokalisation von Glattmuskelaktin und Renin.
- b), d): Alleinige Darstellung der reninmarkierenden Signale.

Der Pfeil markiert reninbildende Zellen im Bereich einer Gefäßgabelung bzw. des Abgangs einer afferenten Arteriole. G = Glomerulus;
Die Vergrößerung ist 400-fach. Der Balken gibt jeweils 20µm an.

Abbildung 3.20 zeigt die unterschiedliche Lagebeziehung zwischen reninbildenden Zellen und Glomerulus bei Kontrolltier und $Vhl^{-/-REN}$ -Tier. Beim Kontrolltier (Abb. 3.20a, c) finden sich reninpositive Zellen in klassischer Lokalisation und mit typischem Erscheinungsbild: Reninbildende Zellen sind ausschließlich dort zu finden, wo die afferente Arteriole in den Glomerulus eintritt, also am vaskulären Pol bzw. in juxtaglomerulärer Position. Jeweils mehrere deutlich gefärbte und kräftig ausgebildete, kuboide Zellen liegen in direktem Kontakt zueinander in juxtaglomerulärer Position.

Beim $Vhl^{-/-REN}$ -Tier (Abb. 3.20b, d) sieht die Situation deutlich anders aus: Direkt am vaskulären Pol finden sich keine reninmarkierenden Signale. In der Nähe des vaskulären Pols lassen sich bei ausschließlicher Darstellung des die reninbildenden Signale wiedergebenden Farbkanals sehr feine und schwache Reninsignale erahnen. Erst in einer gewissen Distanz zum vaskulären Pol finden sich deutliche Reninsignale in der afferenten Arteriole. Diese sind jedoch zarter und schlanker als die Zellen im Kontrolltier. Ihre Form ist eher bandartig als kuboid. Ihre Färbung ist schwächer und ihre Anzahl geringer als im Kontrolltier. Auch in der interlobulären Arterie, welcher die afferente Arteriole entspringt, finden sich, wenn auch sehr feine, reninpositive Signale.

Abbildung 3.21 veranschaulicht die Lokalisation reninbildender Zellen im reninzellspezifischen Vhl -Knockout-Tier im Vergleich zum Kontrolltier nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Beim Kontrolltier (Abb. 3.21a, c) finden sich reninpositive Zellen wieder in klassischer Lokalisation und mit typischem Erscheinungsbild: Der vaskuläre Pol ist dicht besetzt mit deutlich reninpositiven und kräftig ausgebildeten, kuboiden Zellen. Am vaskulären Pol sitzen die reninbildenden Zellen dicht an dicht in der Gefäßwand, ein Bild, das sich etwa bis zur Hälfte der afferenten Arteriole fortsetzt. Auch im Bereich des Abgangs der afferenten Arteriole finden sich bereits reninpositive Zellen. Diese sind jedoch deutlich weniger kräftig ausgebildet und schwächer gefärbt, als die reninpositiven Zellen, die sich am vaskulären Pol oder in dessen Nähe befinden. Die deutlich reninpositiv markierte Ausbuchtung in der linken oberen Ecke stellt den Abgang einer anderen afferenten Arteriole im Bereich einer Gefäßgabelung dar.

Beim $Vhl^{-/-REN}$ -Tier (Abb. 3.21b, d) variiert die Lokalisation der reninbildenden Zellen deutlich vom klassischen Bild: Vaskulärer Pol sowie der überwiegende Teil der afferenten Arteriole bleiben gänzlich frei von reninpositiven Signalen. Lediglich im Bereich des Abgangs der afferenten Arteriole bzw. der Gefäßgabelung finden sich einige zarte, reninpositive Zellen. Erst im Bereich des Abgangs des interlobulären Seitenastes finden sich kräftiger gefärbte reninpositive Zellen. Jedoch sind diese Zellen immer noch feiner, als die des Kontrolltieres. Sie erscheinen nicht zusammenhängend, sondern eher als isolierte, bandartige Strukturen. Ihre Anzahl ist im Vergleich zum Kontrolltier deutlich reduziert.

Für eine weitreichendere Übersicht über die Lokalisation reninbildender Zellen in den jeweiligen Tieren sei auf die Abbildungen 3.7 - 3.10 verwiesen, welche jeweils repräsentative Gewebeschnitte in 100-facher Vergrößerung abbilden.

An dieser Stelle sei lediglich noch einmal ein Gewebeschnitt des unter Normalbedingungen aufgewachsenen $Vhl^{-/-REN}$ -Tieres eingefügt (Abb. 3.22). Da sich auf diesem Schnitt überdurchschnittlich viele reninmarkierende Signale finden, eignet er sich gut, um die Lokalisation reninbildender Zellen bei diesem Genotyp zu studieren.

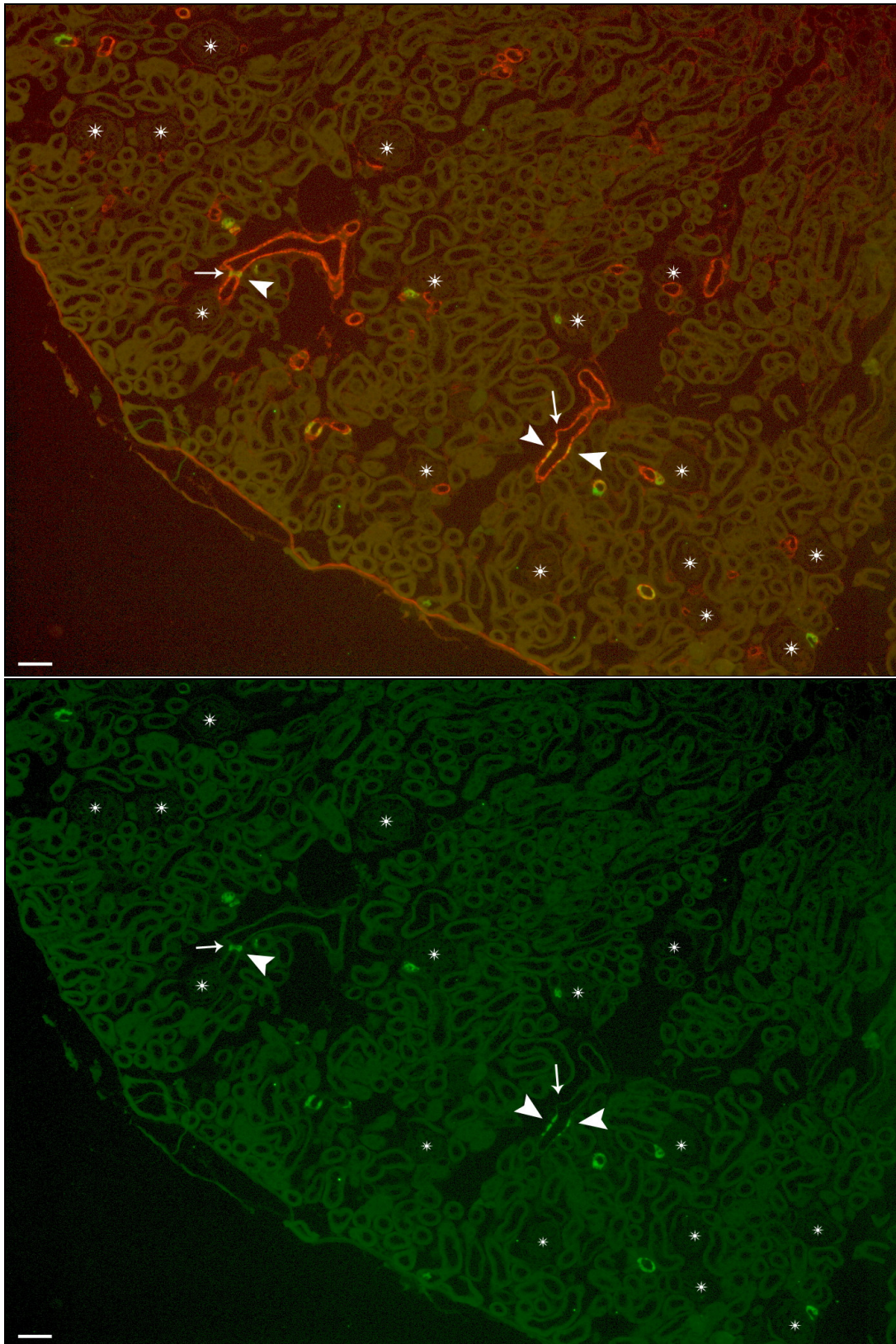


Abb. 3.22 Oben: Immunfluoreszenzdoppelfärbung eines Paraffinschnitts einer adulten $Vhl^{-/-REN}$ -Maus. Gefärbt wurde gegen Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün). Gelb zeigt eine Kolo-kalisation von Renin und Glattmuskelaktin. Unten: **Alleinige Darstellung der reninmarkierenden Signale.** Sterne markieren Glomeruli, Pfeilspitzen atypisch lokalisierte Reninsignale; Pfeile markieren Gefäßabgänge bzw. Gabelungen; Vergrößerung: 100fach; Balken = 50 μm

Abbildung 3.23 veranschaulicht die Ergebnisse einer Auszählung bezüglich der Lokalisation reninbildender Zellen auf immunfluoreszenzgefärbten Gewebeschnitten von $Vhl^{-/-REN}$ -Mäusen und ihren jeweiligen Kontrollgeschwistertieren unter Normalbedingungen und nach Stimulation des RAAS durch Gabe von Nidrigsalzfutter und Enalapril. Diese Daten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Birgül Kurt für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Damit die Ergebnisse der Auszählungen der Gewebeschnitte und der 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen auf einen Blick verglichen werden können, wird Abb. 3.19 in Verbindung mit Abb. 3.23 noch einmal gezeigt.

Die Auszählung anhand der Gewebeschnitte der Kontrolltiere zeigte, dass sich die Lokalisation reninbildender Zellen hier nicht von der allgemein bekannten Lokalisation reninpositiver Zellen in Wildtyptieren unterscheidet.

Für das unter Normalbedingungen aufgewachsene Kontrolltier konnten bei den Auszählungen auf den Gewebeschnitten etwa für ein Drittel der Glomeruli reninpositive Zellen am vaskulären Pol gefunden werden.

Beim reninzellspezifischen Vhl -Knockout-Tier hingegen konnten unter Normalbedingungen auf den Gewebeschnitten für weniger als 10% der Glomeruli reninbildende Zellen am vaskulären Pol identifiziert werden.

Im Gegensatz zum Kontrolltier können beim $Vhl^{-/-REN}$ -Tier unter Normalbedingungen reninpositive Zellen gefunden werden, die sich nicht in juxtaglomerulärer Position befinden. Dieses Phänomen zeigt sich nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzfutter und Enalapril noch stärker ausgeprägt. Dann finden sich prozentual sogar mehr Glomeruli, welche reninpositive Zellen ausschließlich in nicht-juxtaglomerulärer Position aufweisen, als Glomeruli, bei welchen sich reninbildende Zellen am vaskulären Pol befinden. Hier ist auch auffällig, dass beim $Vhl^{-/-REN}$ -Tier nach Stimulation des RAAS prozentual weniger Glomeruli reninpositive Zellen in juxtaglomerulärer Position aufweisen, als unter Normalbedingungen.

Somit entsprechen sich die Auszählung anhand der Gewebeschnitte und die Auszählung anhand der Rekonstruktionen bezüglich der Lokalisation reninpositiver Zellen im reninzellspezifischen Vhl -Knockout-Tier hinsichtlich der jeweils ermittelten Verhältnisse.

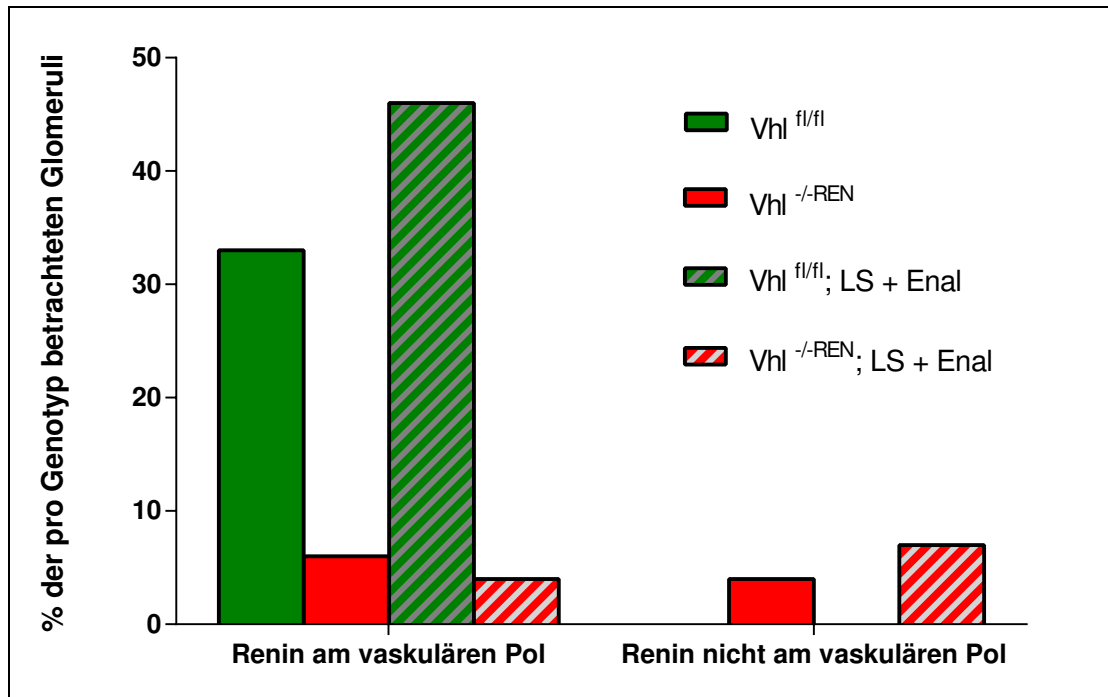


Abb. 3.23 Lagebeziehung zwischen Glomeruli und reninpositiven Zellen - Auszählungen auf immunfluoreszenzgefärbten Gewebeschnitten. LS + Enal = Gabe einer Niedrigsalzdiät und des ACE-Hemmers Enalapril über einen Zeitraum von 3 Wochen. Die Daten für diese Graphik wurden freundlicherweise von Frau Dr. Birgül Kurt für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

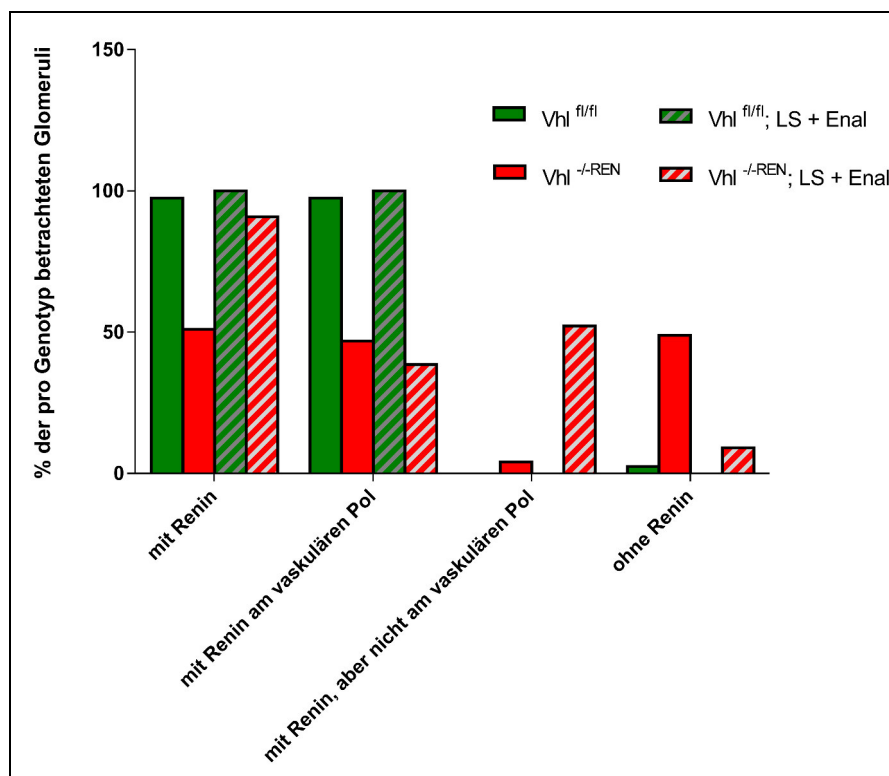


Abb. 3.19 Lagebeziehung zwischen Glomeruli und Renin – Auszählungen an 3D-Gefäßbaum-teilrekonstruktionen. Gezeigt wird das Auftreten verschiedener Lagebeziehungen zwischen Glomeruli und reninbildenden Zellen in % der Gesamtzahl der für diesen Genotyp untersuchten Glomeruli. Pro Genotyp wurde eine Teilrekonstruktion analysiert.

LS + Enal = Gabe einer Niedrigsalzdiät und des ACE-Hemmers Enalapril während 3 Wochen.

Übersicht über die Lokalisation reninbildender Zellen im reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Tier – ermittelt anhand dreidimensionaler Gefäßbaumteilrekonstruktionen

Da nun eine detaillierte Analyse der Lokalisation reninbildender Zellen in der reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Maus folgt, wird zur Orientierung noch einmal Tabelle 3.1 vorangestellt. Diese gibt eine Übersicht über Lage und Verteilung reninpositiver Zellen im Nierengewebe der Genotypen $Vhl^{fl/fl}$ und $Vhl^{-/-REN}$, jeweils unter Normalbedingungen und nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril über einen Zeitraum von drei Wochen.

Lokalisation reninbildender Zellen im Gefäßbaum jeweils in Bezug auf die Glomeruli	Kt-basal	KO-basal	Kt-stim	KO-stim
Glomeruli gesamt	100,00% (40)	100,00% (49)	100,00% (31)	100,00% (44)
Glomeruli mit Renin	97,50% (39)	51,02% (25)	100,00% (31)	90,91% (40)
Glomeruli mit Renin am vaskulären Pol	97,50% (39)	46,94% (23)	100,00% (31)	38,64% (17)
Glomeruli mit Renin, aber nicht am vaskulären Pol		4,08% (2)		52,27% (23)
Glomeruli ohne Renin	2,50% (1)	48,98% (24)		9,09% (4)
Glomeruli mit Renin am vaskulären Pol	97,50% (39)	46,94% (23)	100,00% (31)	38,64% (17)
<u>Renin nur direkt am vaskulären Pol</u>	<u>38,46% (15)</u>	<u>26,53% (13)</u>		<u>2,27% (1)</u>
<u>Renin direkt am vaskulären Pol und weiter proximal im Gefäßbaum</u>	<u>60,00% (24)</u>	<u>20,41% (10)</u>	<u>100,00% (31)</u>	<u>36,36% (16)</u>
Renin am vaskulären Pol und in der afferenten Arteriole	60,00% (24)	18,37% (9)	54,84% (17)	
Renin am vaskulären Pol, in der afferenten Arteriole und weiter proximal		2,04% (1)		25,00% (11)
Renin am vaskulären Pol, in afferenter Arteriole und im Bereich Abgang/Gabelung A. afferens/A. interlobularis			22,58% (7)	
Renin am vask. Pol, in afferenter Arteriole und im Bereich Abgang/Gabelung A. afferens/A. interlobularis und prox. davon			22,58% (7)	
Renin am vask. Pol, dann erst wieder in A. interlobularis, jedoch mit Bezug zum Abgang des Vas afferens des Glomerulus				4,55% (2)
Renin am vaskulären Pol und dann erst wieder weit proximal im Gefäßbaum				6,82% (3)
Glomeruli mit Renin, aber nicht am vaskulären Pol		4,08% (2)		52,27% (23)
Renin erscheint zum ersten Mal in der afferenten Arteriole		2,04% (1)		13,64% (6)
Renin erscheint zum ersten Mal in der afferenten Arteriole und im Abgang der afferenten Arteriole		2,04% (1)		
Renin erscheint zum ersten Mal in A. interlobularis in der Nähe zum Abgang der afferenten Arteriole				22,73% (10)
Renin erscheint zum ersten Mal in A. interlobularis, aber unabhängig vom Vas afferens des Glomerulus				15,91% (7)

Tabelle 3.1 Übersicht über die Lokalisation der reninbildenden Zellen in den betrachteten Gefäßbaumteilkonstruktionen jeweils in Bezug auf die Glomeruli. Angaben in Prozent der in der jeweiligen Rekonstruktion betrachteten Glomeruli. Der absolute Zahlenwert ist in Klammern angegeben. Kt-basal = Vhl^{fl/fl} aufgewachsen unter Normalbedingungen, KO-basal = Vhl^{-/-REN} aufgewachsen unter Normalbedingungen, Kt-stimuliert = Vhl^{fl/fl} nach Stimulation des RAAS, KO stim = Vhl^{-/-REN} nach Stimulation des RAAS durch Nidralgaldzdiät und Enalapril über einen Zeitraum von 3 Wochen

Detaillierte Analyse der Lokalisation reninbildender Zellen im reninzellspezifischen Vhl-Knockout anhand von 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen

Es folgt nun eine ausführliche Analyse der Lokalisation reninbildender Zellen in der reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Maus sowie in entsprechenden Kontrolltieren.

Der Vollständigkeit und Übersicht halber werden einige Ergebnisse, die in dieser Arbeit bereits erläutert wurden, noch einmal wiederholt.

Lokalisation reninbildender Zellen in Tieren des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ und $Vhl^{-/-REN}$ unter Normalbedingungen

Für Tiere des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ fand sich hinsichtlich der Lokalisation reninbildender Zellen kein Unterschied zu Wildtyptieren. So gut wie alle Glomeruli wiesen reninpositive Zellen in juxtaglomerulärer Position auf. Fanden sich für einen Glomerulus keine reninpositiven Zellen in juxtaglomerulärer Position, so waren auch weiter proximal im Gefäßbaum – also distal vom Glomerulus – keine reninmarkierenden Signale mehr zu finden. Proximal der afferenten Arteriole wurden im Gefäßbaum keine reninpositiven Zellen gefunden. Reninbildende Zellen breiteten sich mitunter ein Stück entlang der afferenten Arteriole aus, beschränkten sich jedoch immer auf diese (Tab 3.2).

Neben der geringeren Abundanz reninbildender Zellen, fiel im Vergleich von $Vhl^{fl/fl}$ - und $Vhl^{-/-REN}$ -Tier besonders auf, dass viele Glomeruli des $Vhl^{-/-REN}$ -Tiers keine reninpositiven Zellen am vaskulären Pol aufwiesen.

Bei einer detaillierten Analyse der Gefäßbaumteilrekonstruktion des $Vhl^{-/-REN}$ -Tiers konnten für ca. 50% der Glomeruli an keiner Stelle der sie versorgenden Gefäßbahn im Nierengefäßbaum reninpositive Zellen gefunden werden. Das bedeutet, bei diesen Glomeruli befinden sich weder am vaskulären Pol, noch in der afferenten Arteriole oder in einem anderen, weiter proximal gelegenen Teil des Gefäßbaums, welcher Blut auf dem direkstmöglichen Weg in Richtung des Glomerulus leitet, reninbildende Zellen.

Zudem stach hervor, dass im $Vhl^{-/-REN}$ -Tier einige der Glomeruli zwar reninpositive Zellen in der afferenten Arteriole aufwiesen, jedoch nicht in der typischen juxtaglomerulären

Position, sondern erst in einer gewissen Distanz zum vaskulären Pol. Diese Konstellation fand sich bei 4% der ausgezählten Glomeruli.

Ebenfalls 4% der ausgezählten Glomeruli fielen dadurch auf, dass sich reninbildende Zellen im Bereich des Abgangs der afferenten Arteriole aus der A. interlobularis fanden. Dies schien unabhängig davon aufzutreten, ob Renin am vaskulären Pol vorzufinden war oder nicht (Tab 3.3).

Bezüglich der räumlichen Ausbreitung der reninbildenden Zellen vom vaskulären Pol aus in die afferente Arteriole hinein, fand sich ein leichter Unterschied zwischen $Vhl^{fl/fl}$ - und $Vhl^{-/-REN}$ -Tier. Beim $Vhl^{-/-REN}$ -Tier war die Quantität sowie die räumliche Ausbreitung der reninbildenden Zellen im Vergleich zum Kontrolltier geringer. Reninpositive Zellen konnten in ihrer Ausbreitung seltener bis in die afferente Arteriole hinein gefunden werden und insgesamt besetzten sie in ihrer räumlichen Ausbreitung einen geringeren Anteil der afferenten Arteriole als beim Kontrolltier. Das Verhältnis der Glomeruli, bei welchen sich die reninbildenden Zellen auf den vaskulären Pol beschränkten, zu denen, bei welchen sich reninbildende Zellen in Teile der afferenten Arteriole fortsetzten, betrug beim $Vhl^{fl/fl}$ -Tier 1 : 1.7 , beim $Vhl^{-/-REN}$ -Tier 1 : 0.8 (Tab 3.1).

Tabelle 3.2 Vhl^{fl/fl}: Übersicht über die Lokalisation reninbildender Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli	(Teil-)Menge aller Glomeruli	Untergruppe
Glomeruli gesamt	100% (40)	
Glomeruli mit Renin	97,50% (39)	
Glomeruli ohne Renin	2,50% (1)	
Glomeruli mit Renin	97,50% (39)	
<u>Glomeruli mit Renin direkt am vaskulären Pol</u>	<u>97,50% (39)</u>	<u>100,00% (39)</u>
<u>Renin nur am vaskulären Pol</u>	<u>38,46% (15)</u>	<u>38,46% (15)</u>
<u>Renin am vaskulären Pol und in der afferenten Arteriole</u>	<u>60,00% (24)</u>	<u>61,54% (24)</u>
Renin am vaskulären Pol und leicht in die afferente Arteriole hineinragend	33,33% (13)	33,33% (13)
Renin am vaskulären Pol und deutlich in die afferente Arteriole hineinragend	12,82% (5)	12,82% (5)
Renin am vaskulären Pol und in der afferenten Arteriole	15,38% (6)	15,38% (6)

Tabelle 3.2 Übersicht über die Lokalisation der reninbildenden Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli im Vhl^{fl/fl}-Tier.

Die Werte geben an, für welchen Prozentsatz an Glomeruli die jeweilige Lokalisation reninpositiver Zellen gefunden wurde. Betrachtet wurden die Glomeruli einer Gefäßbaumteilrekonstruktion eines Tiers des Genotyps Vhl^{fl/fl} - das Tier wuchs unter Normalbedingungen auf. Die absoluten Zahlenwerte werden in Klammern angegeben. In der letzten Spalte erfolgen die Angaben bezogen auf eine ausgewählte Untergruppe von Glomeruli.

Tabelle 3.3 Vhl^{-/-REN}: Lokalisation der reninbildenden Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli	(Teil-)Menge aller Glomeruli	Untergruppen	
Glomeruli gesamt	100,00% (49)		
Glomeruli mit Renin	51,02% (25)		
<u>Glomeruli mit Renin direkt am vaskulären Pol</u>	<u>46,94% (23)</u>		
<u>Vorkommen von Renin ohne Kontakt zum vaskulären Pol</u>	<u>4,08% (2)</u>		
Glomeruli mit Renin	51,02% (25)		
<u>Renin direkt am vaskulären Pol gesamt</u>	<u>46,94% (23)</u>	<u>100,00% (23)</u>	
<i>Renin nur am vaskulären Pol</i>	26,53% (13)	56,52% (13)	100,00% (13)
Renin sehr spärlich am vaskulären Pol	2,04% (1)	4,35% (1)	7,69% (1)
Renin am vaskulären Pol	24,49% (12)	52,17% (12)	92,31% (12)
<i>Renin nur am vaskulären Pol und in der afferenten Arteriole</i>	18,37% (9)	39,13% (9)	100,00% (9)
Renin spärlich am vaskulären Pol und sehr spärlich in der afferenten Arteriole	2,04% (1)	4,35% (1)	11,11% (1)
Renin am vaskulären Pol und leicht in die afferente Arteriole hineinragend	10,20% (5)	21,74% (5)	55,56% (5)
Renin am vaskulären Pol und in die afferente Arteriole hineinragend	6,12% (3)	13,04% (3)	33,33% (3)
<i>Renin am vaskulären Pol und über die afferente Arteriole hinaus zu finden</i>	2,04% (1)	4,35% (1)	
Renin am vaskulären Pol, in der gesamten afferenten Arteriole und in der Gabelung zweier afferenter Arteriolen	2,04% (1)	4,35% (1)	
<u>Renin nicht direkt am vaskulären Pol</u>	<u>4,08% (2)</u>	<u>100,00% (2)</u>	
Renin mittig in der afferenten Arteriole	2,04% (1)	50,00% (1)	
Renin nicht direkt am vask. Pol, aber in der afferenten Arteriole und spärlich in der Gabelung zweier afferenter Arteriolen	2,04% (1)	50,00% (1)	

Tabelle 3.3 Übersicht über die Lokalisation der reninbildenden Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli im Vhl^{-/-REN}-Tier. Die Werte geben an, für welchen Prozentsatz an Glomeruli die jeweilige Lokalisation reninpositiver Zellen gefunden wurde. Betrachtet wurden die Glomeruli einer Gefäßbaumteilrekonstruktion eines Tiers des Genotyps Vhl^{-/-REN} - das Tier wuchs unter Normalbedingungen auf. Die absoluten Zahlenwerte werden in Klammern angegeben. In den letzten Spalten erfolgen die Angaben bezogen auf ausgewählte Untergruppen von Glomeruli.

Lokalisation reninbildender Zellen in Tieren des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ und $Vhl^{-/-REN}$ nach Stimulation des RAAS

Bezüglich der Lage und Verteilung reninbildender Zellen in der reninzellspezifischen Vhl -Knockout-Maus nach Stimulation des RAAS durch Gabe von Niedrigsalzfutter und Enalapril wurde in dieser Arbeit bereits festgestellt,

- dass die Anzahl wie auch die Dichte reninpositiver Zellen in der Gefäßwand niedriger war, als beim stimulierten Kontrollgeschwistertier.
- dass auch nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril noch immer etwa 10% der betrachteten Glomeruli überhaupt keine reninbildenden Zellen in den Wänden ihrer Gefäße aufwiesen, weder in ihrer afferenten Arteriole noch in der A. interlobularis oder in einem anderen ihnen auf direktem Weg Blut zuführenden Gefäß des Nierengefäßbaums.
- dass weitere gute 50% der betrachteten Glomeruli keine reninbildenden Zellen an der typischen juxtaglomerulären Position aufwiesen. Hierbei zeigten sich für rund 75% dieser Glomeruli reninbildende Zellen zum ersten Mal in der A. interlobularis, während die afferente Arteriole gänzlich frei von reninbildenden Zellen blieb.
- dass lediglich knappe 40% der analysierten Glomeruli an ihrem vaskulären Pol reninbildende Zellen aufwiesen. Nur für einen einzigen dieser Glomeruli beschränkten sich die reninbildenden Zellen in ihrer Lokalisation auf den glomerulären vaskulären Pol. Bei den anderen breiteten sich die reninbildenden Zellen auch in der afferenten Arteriole des Glomerulus und darüber hinaus aus bzw. es fanden sich weitere reninpositive Zellen in einem Teil des Gefäßbaums, der sich proximal der afferenten Arteriole befand, aber an der direkten Blutversorgung des Glomerulus beteiligt war.
- dass die häufige Lokalisation reninbildender Zellen im Bereich von Gefäßabgängen und Gefäßgabelungen auffällig war.

Beim Kontrolltier bot sich hingegen das gleiche Bild, welches sich im Nierengewebe von Wildtyptieren zeigt, wenn das RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril stimuliert wurde. In der erstellten Gefäßbaumteilrekonstruktion konnten am vaskulären Pol eines jeden Glomerulus reninpositive Zellen gefunden werden. Niemals war die Ausbreitung der reninbildenden Zellen auf den Bereich des vaskulären Pols limitiert. Jedoch beschränkte sie sich in ca. 55% der Fälle auf die afferente Arteriole. Bei wiederum 50% dieser Glomeruli fanden sich in der gesamten afferenten Arteriole reninpositive Zellen. Wurden reninpositive Zellen noch jenseits der afferenten Arteriole eines Glomerulus gefunden, so beschränkten sie sich in ihrer Ausbreitung in 50% der Fälle auf den Bereich der Gefäßgabelung, an welcher die jeweilige afferente Arteriole abging. Für die anderen 50% dieser Glomeruli fanden sich eher spärliche reninmarkierende Signale in den jeweiligen Aa. interlobulares, wobei die afferenten Arteriolen in diesen Fällen dicht mit reninpositiven Zellen besetzt waren. Auch in zwei noch weiter proximal im Gefäßbaum gelegenen Gefäßgabelungen fanden sich reninpositive Zellen. Diese waren an der direkten Blutversorgung von ca. 13% der Glomeruli beteiligt (Tab. 3.5).

Nach Stimulation des RAAS durch Gabe von Nidrigsalzfutter und Enalapril bot die Gefäßbaumteilrekonstruktion der reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Maus hinsichtlich der Lokalisation reninpositiver Zellen ein eher unübersichtliches, chaotisch anmutendes Bild. Dies ist unter anderem auch auf das Vorhandensein zahlreicher interlobulärer Seiten- und Unteräste im rekonstruierten Gefäßbaumausschnitt zurückzuführen.

Deshalb wurden hier die Glomeruli für die detaillierte Analyse der Lokalisation reninbildender Zellen in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe umfasst diejenigen Glomeruli, bei welchen reninmarkierende Signale am vaskulären Pol gefunden wurden, die andere diejenigen Glomeruli, bei welchen erst weiter proximal im Gefäßbaum reninpositive Zellen erschienen.

Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht über diese Gruppen in Prozentangaben und in absoluten Zahlenwerten.

Glomeruli gesamt	100% (44)
Glomeruli mit Renin am vaskulären Pol	38,64% (17)
Glomeruli mit Renin aber nicht am vaskulären Pol	52,27% (23)
Glomeruli ohne Renin	9,09% (4)

Tab. 3.4 Übersicht über die Beziehung von Glomeruli und reninbildenden Zellen in der Gefäßbaumteilrekonstruktion einer Maus des Genotyps $Vhl^{-/-REN}$ nach Stimulation des RAAS durch Nidigsalzdiät und Enalapril. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Gesamtzahl der in der Rekonstruktion betrachteten Glomeruli. Die absoluten Zahlenwerte sind in Klammern angegeben

Die Gruppe der Glomeruli, welche reninpositive Zellen an ihrem vaskulären Pol aufwiesen, umfasste knapp 40% der Glomeruli der Gefäßbaumteilrekonstruktion.

Mit Ausnahme eines einzigen Glomerulus breiteten sich die reninbildenden Zellen bei allen diesen Glomeruli über den vaskulären Pol hinaus aus. Für etwa 23% der Glomeruli dieser Gruppe beschränkten sich die reninpositiven Zellen auf die jeweilige afferente Arteriole und den Bereich ihres Abgangs. Bei den übrigen Glomeruli dieser Gruppe fanden sich reninbildende Zellen auch in Abschnitten des Gefäßbaums, die proximal der afferenten Arteriole lagen, dem Glomerulus aber auf direktem Wege Blut zuführten. Dann fanden sich reninmarkierende Signale hauptsächlich in den Bereichen von Gefäßabgängen und –gabelungen. In den afferenten Arteriolen solcher Glomeruli waren reninbildende Zellen in unterschiedlicher Anordnung und Dichte zu finden. Mitunter sparten die reninpositiven Zellen die afferente Arteriole – abgesehen vom vaskulären Pol - komplett aus und erschienen erst wieder weiter proximal im Gefäßbaum. Nur für knapp 18% der Glomeruli an deren vaskulärem Pol sich reninbildende Zellen befanden, konnten jenseits der afferenten Arteriole im Gefäßbaum reninpositive Signale gefunden werden, die sich nicht im Bereich von Gefäßabgängen und –gabelungen befanden. Hierbei handelte es sich stets um spärliche Signale (Tab. 3.6).

Die Gruppe der Glomeruli, für welche zwar reninpositive Zellen auf ihrer direkten Zuflussbahn im Gefäßbaum gefunden werden konnten, die aber an ihrem vaskulären Pol keine reninmarkierenden Signale aufwiesen, umfasste gut 50% der Glomeruli dieser Gefäßbaumteilrekonstruktion. Für knapp 14% der Glomeruli dieser Gruppe wurden die ersten reninmarkierenden Signale vom Glomerulus aus gesehen in der afferenten Arteriole gefunden, für knapp 23% in einem interlobulären Gefäß, dort jedoch im

Bereich des Abgangs der afferenten Arteriole des jeweiligen Glomerulus. In knapp 16% der Fälle fanden sich vom Glomerulus aus gesehen die ersten reninpositiven Zellen in einem interlobulären Gefäß, jedoch ohne Bezug zum Abgang der afferenten Arteriole des jeweiligen Glomerulus. Für 9% der betrachteten Glomeruli wurden reninmarkierende Signale auf ihrer Zuflussbahn jenseits der afferenten Arteriole und ohne Bezug zu einem Gefäßabgang oder einer Gefäßgabelung gefunden. Diese Signale waren wieder eher spärlich (Tab. 3.7).

Insgesamt konnten für 11% der Glomeruli in dieser Rekonstruktion im Verlauf ihrer Zuflussbahn Reninsignale jenseits der afferenten Arteriole gefunden werden, welche keinen Bezug zu Gefäßabgängen bzw. Gefäßgabelungen hatten. Ca. 80% der Glomeruli wiesen mindestens einmal im Verlauf ihrer Zuflussbahn reninpositive Zellen im Bereich einer Gefäßgabelung bzw. eines Gefäßabgangs auf.

Insgesamt traten im $Vhl^{-/-REN}$ -Tier nach Stimulation des RAAS bei einem deutlich höheren Prozentsatz von Glomeruli reninbildende Zellen auf, die sich zwar auf der direkten Zuflussbahn des Glomerulus, aber proximal der afferenten Arteriole im Gefäßbaum befanden, als beim entsprechenden Kontrolltier. Im $Vhl^{-/-REN}$ -Tier zeigten sich reninbildende Zellen insgesamt weiter proximal im Gefäßbaum und somit weiter vom Glomerulus entfernt. Hervorzuheben ist, dass nach Stimulation des RAAS in rund 40% der afferenten Arteriolen des $Vhl^{-/-REN}$ -Tiers keine reninbildenden Zellen zu finden waren, wohingegen beim Kontrolltier nach RAAS Stimulation 100% der afferenten Arteriolen reninbildende Zellen aufwiesen, zudem in dichter Besetzung (Tab. 3.5, 3.6 und 3.7).

Nach Stimulation des RAAS wurden in der Gefäßbaumteilrekonstruktion des $Vhl^{-/-REN}$ -Tiers insgesamt 19 mal reninmarkierende Signale im Bereich von Gefäßabgängen und Gefäßgabelungen lokalisiert. Hierbei waren insgesamt neun Gefäßgabelungen involviert, bei sechs dieser Gabelungen fanden sich die reninpositiven Zellen ausschließlich in der Gabelung ohne sich weiter in den Bereich des Abgangs eines der beteiligten Gefäße auszubreiten. Detailliertere Informationen über die Lokalisation reninbildender Zellen in Gefäßabgängen und Gefäßgabelungen gibt Tabelle 3.8.

Exkurs Gefäßbaumnomenklatur:

Zum erleichterten Verständnis der nun folgenden Tabellen geht hier eine kurze Erläuterung zur verwendeten Nomenklatur der Äste des Nierengefäßbaums in der Maus voraus, denn hierzu werden in der gängigen Literatur distal der A. arcuata keine genauen Angaben gemacht. Große Gefäße, welche primär aus der A. arcuata entspringen, wurden als arcuate Seitenäste bezeichnet, die ursprüngliche A. arcuata wird so zum arcuaten Hauptstamm (Machura 2007: 74). Dem arcuaten Seitenast entspringt die A. interlobularis. Aufgrund der starken Verästelung des Gefäßbaums des $Vhl^{-/-REN}$ -Tiers, dessen RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril stimuliert worden war, wurde in dieser Arbeit die A. interlobularis in ihrer Nomenklatur noch untergliedert. Somit entspringt dem arcuaten Seitenast zunächst der interlobuläre Hauptast, dem wiederum der interlobuläre Seitenast und dem schließlich der interlobuläre Unterast. Je nach dem Grad der Verästelung, entspringen aus diesen Gefäßen dann die jeweiligen afferenten Arteriolen. Zweigte sich die A. interlobularis - abgesehen von den afferenten Arteriolen - nicht weiter auf, wurde sie der Einfachheit halber als A. interlobularis geführt. (Abb. 3.29b wird zur Veranschaulichung hier schon einmal gezeigt, siehe auch Abb. 3.31b).

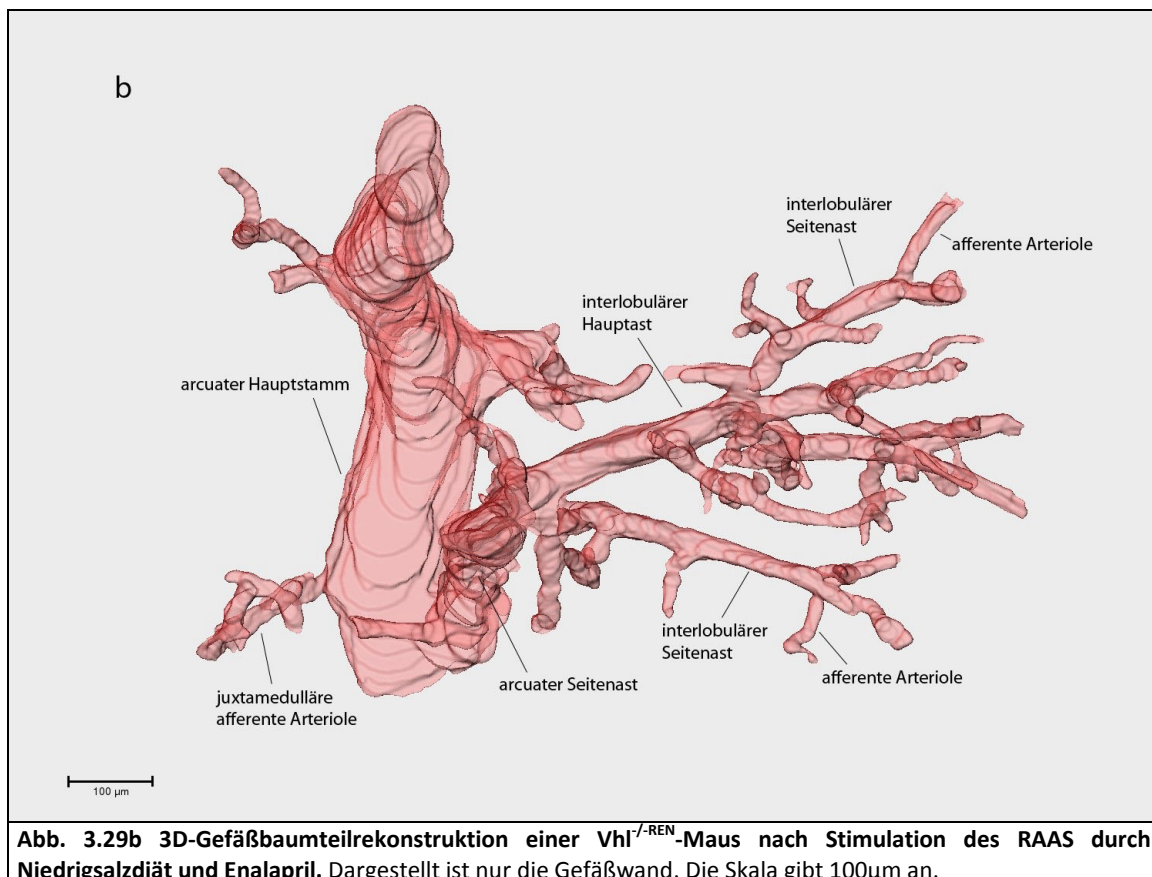


Abb. 3.29b 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktion einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Dargestellt ist nur die Gefäßwand. Die Skala gibt 100µm an.

Tabelle 3.5 Vhl^{ri/ri} nach Stimulation des RAAS: Übersicht über die Lokalisation der reninbildenden Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli	(Teil-)Menge aller Glomeruli	Untergruppen
Glomeruli gesamt	100,00% (31)	
Glomeruli mit Renin am vaskulären Pol	100,00% (31)	
<u>Renin am vaskulären Pol und in der afferenten Arteriole</u>	<u>54,84% (17)</u>	<u>100,00% (17)</u>
Renin im distalen Viertel der afferenten Arteriole	3,23% (1)	5,88% (1)
Renin im distalen Drittel der afferenten Arteriole	9,68% (3)	17,65% (3)
Renin in der distalen Hälfte der afferenten Arteriole	6,45% (2)	11,76% (2)
Renin in den distalen zwei Dritteln der afferenten Arteriole	6,45% (2)	11,76% (2)
Renin in den distalen 4/5 der afferenten Arteriole	3,23% (1)	5,88% (1)
Renin in der gesamten afferenten Arteriole	25,81% (8)	47,06% (8)
<u>Renin am vaskulären Pol, in der afferenten Arteriole und im Bereich Abgang/Gabelung afferente Arteriole/A. interlobularis</u>	<u>22,58% (7)</u>	<u>100,00% (7)</u>
Renin in der gesamten afferenten Arteriole und in der Gabelung der zwei afferenten Arteriolen	6,45% (2)	28,57% (2)
Renin in der gesamten afferenten Arteriole, der Gabelung der zwei afferenten Arteriolen und in der A. interlobularis auf Höhe der Gabelung	6,45% (2)	28,57% (2)
Renin in der distalen Hälfte der afferenten Arteriole und an der Gabelung von afferenter Arteriole und A. interlobularis	6,45% (2)	28,57% (2)
Renin in der distalen Hälfte der afferenten Arteriole und in der A. interlobularis auf Höhe der Abzweigung der afferenten Arteriole	3,23% (1)	14,29% (1)
<u>Renin am vaskulären Pol, in der afferenten Arteriole und im Bereich Abgang/Gabelung afferente Arteriole/A. interlobularis und proximal davon</u>	<u>22,58% (7)</u>	<u>100,00% (7)</u>
Renin in der gesamten afferenten Arteriole und spärlich proximal in der A. interlobularis	6,45% (2)	28,57% (2)
Renin in der gesamten afferenten Arteriole, in der Gabelung afferente Arteriole/A. interlobularis und proximal spärlich in der A. interlobularis	3,23% (1)	14,29% (1)
Renin in gesamtem Vas afferens, zum Teil in interlobulärem Seitenast und im Abgang von interlobulärem Seitenast aus interlobulärem Hauptast	6,45% (2)	28,57% (2)
Renin in gesamtem Vas afferens, in der Gabelung der beiden afferenten Arteriolen und im Abgang der A. interlobularis aus arcuatem Seitenast	6,45% (2)	28,57% (2)

Tabelle 3.5 Übersicht über die Lokalisation der reninbildenden Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli. Auswertung einer Gefäßbaumteilrekonstruktion eines Tiers des Genotyps Vhl^{ri/ri} nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Die Werte geben an, für welchen Prozentsatz an Glomeruli die jeweilige Lokalisation reninpositiver Zellen gefunden wurde. Die absoluten Zahlenwerte werden in Klammern angegeben. In der letzten Spalte erfolgen die Angaben bezogen auf ausgewählte Untergruppen von Glomeruli.

Tabelle 3.6		
VHL^{-/-REN} nach Stimulation des RAAS: Übersicht über die Lokalisation reninbildender Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli		
- betrachtet wurden nur Glomeruli mit reninpositiven Zellen in juxtaglomerulärer Position		
	(Teil-)Menge aller Glomeruli der Rekonstruktion	(Teil-)Menge aller Glomeruli mit Renin am vaskulären Pol
Renin am vaskulären Pol	38,63% (17)	100% (17)
Renin nur direkt am vaskulären Pol	2,27% (1)	5,88% (1)
Renin direkt am vaskulären Pol und weiter proximal im Gefäßbaum	36,36% (16)	94,12% (16)
<u>Renin direkt am vaskulären Pol und weiter proximal im Gefäßbaum</u>	<u>36,36% (16)</u>	<u>94,12% (16)</u>
<u>Renin am vaskulären Pol, in der afferenten Arteriole und weiter proximal im Gefäßbaum</u>	<u>25,00% (11)</u>	<u>64,71% (11)</u>
Renin direkt am vaskulären Pol und leicht in die afferente Arteriole hineinragend	6,82% (3)	17,65% (3)
Renin direkt am vaskulären Pol, leicht in die afferente Arteriole hineinragend und am Abgang des Vas afferens aus der A. interlobularis	2,27% (1)	5,88% (1)
Renin direkt am vaskulären Pol, leicht in die afferente Arteriole hineinragend, am Abgang der afferenten Arteriole und reichlich im interlobulären Seitenast vor dessen Aufspaltung in zwei afferente Arteriolen und in proximalen Abgängen	2,27% (1)	5,88% (1)
Renin direkt am vask. Pol, mittig in afferenter Arteriole und an finaler Gabelung der A. interlobularis in Vasa afferentia und prox. Abgänge	2,27% (1)	5,88% (1)
Renin direkt am vask. Pol, locker in gesamtem Vas afferens und am Abgang des interlobulären Seitenastes aus dem interlobulären Hauptast	2,27% (1)	5,88% (1)
Renin direkt am vaskulären Pol, in gesamtem Vas afferens, in Gabelung mit A. interlobularis und an proximalen Abgängen	2,27% (1)	5,88% (1)
Renin direkt am vaskulären Pol, locker in distaler Hälfte des Vas afferens, sehr spärlich in A. interlobularis und an prox. Abgängen	2,27% (1)	5,88% (1)
Renin direkt am vaskulären Pol, dicht in distaler Hälfte des Vas afferens, sehr spärlich in A. interlobularis und an prox. Abgängen	2,27% (1)	5,88% (1)
Renin direkt am vask. Pol, am Abgang des Vas afferens und an der Aufspaltung der A. interlobularis in zwei Vasa afferentia und an prox. Abgängen	2,27% (1)	5,88% (1)
<u>Renin am vaskulären Pol, dann erst wieder in A. interlobularis, jedoch mit Bezug zum Abgang des Vas afferens des Glomerulus</u>	<u>4,55% (2)</u>	<u>11,76% (2)</u>
Renin direkt am vaskulären Pol und in A. interlobularis knapp proximal der finalen Aufteilung in zwei Vasa afferentia	2,27% (1)	5,88% (1)
Renin direkt am vask. Pol, an der Aufgabelung des interlobulären Unterastes in zwei Vasa afferentia, an Aufgabelung des interlobulären Seitenastes und an prox. Abgängen	2,27% (1)	5,88% (1)
<u>Renin am vaskulären Pol und dann erst wieder weit proximal des Glomerulus im Gefäßbaum</u>	<u>6,82% (3)</u>	<u>17,65% (3)</u>
Renin direkt am vaskulären Pol und an proximal im Gefäßbaum gelegenen Abgängen	2,27% (1)	5,88% (1)
Renin direkt am vaskulären Pol und am Abgang des interlobulären Seitenastes aus dem interlobulären Hauptast	2,27% (1)	5,88% (1)
Renin direkt am vaskulären Pol, an der Gabelung afferente Arteriole/A. interlobularis, am Abgang des interlobulären Seitenastes aus dem interlobulären Hauptast und spärlich in interlobulärem Hauptast	2,27% (1)	5,88% (1)

Tabelle 3.7 VHL^{-/-REN} nach Stimulation des RAAS:	(Teil-)Menge aller Glomeruli der Rekonstruktion	Glomeruli mit Renin aber nicht am vaskulären Pol	Unter- gruppen
Übersicht über die Lokalisation reninbildender Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli			
- betrachtet wurden nur Glomeruli mit reninpositiven Zellen aber nicht in juxtaglomerulärer Position			
Glomeruli mit Renin aber nicht am vaskulären Pol	52,27% (23)	100% (23)	
Renin erscheint zum ersten Mal in der afferenten Arteriole	13,64% (6)	26,09% (6)	100% (6)
Renin erscheint nur mittig in der afferenten Arteriole	2,27% (1)	4,35% (1)	16,67% (1)
Renin erscheint spärlich in afferenter Arteriole, spärlich an deren Abgang, dann spärlich in A. interlobularis und an proximalen Abgängen	2,27% (1)	4,35% (1)	16,67% (1)
Renin erscheint spärlich im distalen Bereich der afferenten Arteriole und dann in Gabelung der A. interlobularis in zwei Aa. interlobulares	2,27% (1)	4,35% (1)	16,67% (1)
Renin erscheint im proximalen Bereich der afferenten Arteriole und dann in Gabelung der A. interlobularis in zwei Aa. interlobulares	2,27% (1)	4,35% (1)	16,67% (1)
Renin erscheint im distalen Bereich der afferenten Arteriole, in der Aufspaltung des interlobulären Seitenastes in zwei interlobuläre Unteräste und am Abgang des interlobulären Seitenastes aus dem interlobulären Hauptast	2,27% (1)	4,35% (1)	16,67% (1)
Renin erscheint am Abgang der afferenten Arteriole, in der Aufspaltung des interlobulären Seitenastes in zwei interlobuläre Unteräste und am Abgang des interlobulären Seitenastes aus dem interlobulären Hauptast	2,27% (1)	4,35% (1)	16,67% (1)
Renin erscheint zum ersten Mal in der A. interlobularis in der Nähe des Abgangs der afferenten Arteriole	22,73% (10)	43,48% (10)	100,00% (10)
Renin erscheint zum ersten Mal in der A. interlobularis auf Höhe des Abgangs der afferenten Arteriole	4,55% (2)	8,70% (2)	20,00% (2)
Renin erscheint zum ersten Mal in der A. interlobularis auf Höhe des Abgangs der afferenten Arteriole und an proximalen Abgängen	4,55% (2)	8,70% (2)	20,00% (2)
Renin erscheint spärlich in der Aufgabelung des interlobulären Unterastes in zwei afferente Arteriolen, im interlobulären Unterast und in der Gabelung interlobulärer Unterast/interlobulärer Seitenast	2,27% (1)	4,35% (1)	10,00% (1)
Renin erscheint in der finalen Gabelung des interlobulären Unterastes in zwei afferente Arteriolen, in der Aufgabelung des interlobulären Hauptastes in zwei interlobuläre Seitenäste und an proximalen Abgängen aus dem interlobulären Hauptast	6,82% (3)	13,04% (3)	30,00% (3)
Renin erscheint zum ersten Mal in der A. interlobularis direkt proximal der finalen Gabelung in zwei afferente Arteriolen	2,27% (1)	4,35% (1)	10,00% (1)
Renin erscheint zum ersten Mal in der A. interlobularis direkt proximal der finalen Gabelung in zwei afferente Arteriolen und an proximalen Abgängen	2,27% (1)	4,35% (1)	10,00% (1)
Renin erscheint zum ersten Mal in der A. interlobularis aber unabhängig vom Abgang der afferenten Arteriole des Glomerulus	15,91% (7)	30,43% (7)	100,00% (7)
Renin erscheint zum ersten Mal an proximalen Abgängen der A. interlobularis	4,55% (2)	8,70% (2)	28,57% (2)
Renin erscheint zum ersten Mal spärlich in A. interlobularis, dann an proximalen Abgängen	4,55% (2)	8,70% (2)	28,57% (2)
Renin erscheint zum ersten Mal in der Aufspaltung des interlobulären Seitenastes in zwei interlobuläre Unteräste	4,55% (2)	8,70% (2)	28,57% (2)
Renin erscheint in der Aufspaltung des interlobulären Seitenastes in zwei interlobuläre Unteräste und am Abgang des interlobulären Seitenastes aus dem interlobulären Hauptast	2,27% (1)	4,35% (1)	14,29% (1)

Tabelle 3.6 Übersicht über die Lokalisation der reninbildenden Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli. Auswertung einer Gefäßbaumteilrekonstruktion eines Tiers des Genotyps $Vhl^{-/-REN}$ nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Ausgewertet wurde nur die Lagebeziehung zwischen Glomeruli, welche reninpositive Zellen an ihrem vaskulären Pol aufweisen und reninbildenden Zellen, die sich im Gefäßbaum auf dem Weg der direkten Blutversorgung der jeweiligen Glomeruli befinden. Die Werte geben an, für welchen Prozentsatz an Glomeruli die jeweilige Lokalisation reninpositiver Zellen gefunden wurde. In der zweiten Spalte werden die Prozentangaben in Bezug auf die Gesamtzahl der Glomeruli in der Rekonstruktion gemacht, in der dritten Spalte erfolgen die Prozentangaben in Bezug auf die Menge derjenigen Glomeruli mit reninpositiven Zellen am vaskulären Pol. Die absoluten Zahlenwerte werden jeweils in Klammern angegeben.

Tabelle 3.7 Übersicht über die Lokalisation der reninbildenden Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli. Auswertung einer Gefäßbaumteilrekonstruktion eines Tiers des Genotyps $Vhl^{-/-REN}$ nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Ausgewertet wurde nur die Lagebeziehung zwischen Glomeruli, welche keine reninpositiven Zellen an ihrem vaskulären Pol aufweisen und reninbildenden Zellen, die sich im Gefäßbaum auf dem Weg der direkten Blutversorgung der Glomeruli befinden. Die Werte geben an, für welchen Prozentsatz an Glomeruli die jeweilige Lokalisation reninpositiver Zellen gefunden wurde. In der zweiten Spalte werden die Prozentangaben in Bezug auf die Gesamtzahl der Glomeruli in der Rekonstruktion gemacht, in der dritten Spalte erfolgen die Prozentangaben in Bezug auf die Menge derjenigen Glomeruli, die keine reninpositiven Zellen am vaskulären Pol aufweisen, für die jedoch in anderen Bereichen ihrer direkten Zuflussbahn im Gefäßbaum reninbildende Zellen gefunden werden können. In der vierten Spalte werden die Angaben in Bezug auf ausgewählte Untergruppen gemacht. Die absoluten Zahlenwerte werden jeweils in Klammern angegeben.

Tabelle 3.8 Übersicht über das Vorkommen reninbildender Zellen, welche sich an Abgängen oder Gabelungen befinden und deren genaue Lokalisation im Gefäßbaum. Auswertung einer Gefäßbaumteilrekonstruktion eines Tiers des Genotyps $Vhl^{-/-REN}$ nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Die Angaben erfolgen in Prozent bezogen auf die Gesamtzahl der Loci an denen in dieser Rekonstruktion Reninvorkommen im Bereich von Gefäßabgängen und Gefäßgabelungen identifiziert werden konnten. Die absoluten Zahlenwerte sind jeweils in Klammern angegeben.

Tabelle 3.8 Vhl^{1/-REN} nach Stimulation des RAAS: Reninvorkommen an Abgängen und Gabelungen	
	(Teil-) Menge der Gefäßabgänge bzw. -gabelungen, an welchen reninpositive Signale gefunden werden können
<u>Vorkommen reninpositiver Zellen an Abgängen und Gabelungen</u>	
Reninvorkommen an Abgängen und Gabelungen	100% (19)
Reninvorkommen in Gabelungen	47,37% (9)
Renin nur in Gabelung	31,58% (6)
<u>Verteilung reninpositiver Zellen an Abgängen und Gabelungen</u>	
Renin am Abgang einer afferenten Arteriole aus einer A. interlobularis	31,58% (6)
Renin an Gabelung afferente Arteriole/A. interlobularis	5,26% (1)
Renin am Abgang einer afferenten Arteriole aus A. interlobularis und in Gabelung	10,53% (2)
Renin am Abgang der afferenten Arteriole, in Gabelung und weiter proximal in A. interlobularis	5,26% (1)
Renin an Gabelung von zwei afferenten Arteriolen	15,79% (3)
Renin in A. interlobularis am Abgang einer afferenten Arteriole aus A. interlobularis	5,26% (1)
Renin in A. interlobularis nahe der Aufteilung in afferente Arteriolen	5,26% (1)
Renin an Gabelung von interlobulärem Seitenast	10,53% (2)
Renin am Abgang von interlobulärem Seitenast aus interlobulärem Hauptast	10,53% (2)
Renin in A. interlobularis ohne nahen Gefäßabgang	2

3.2. Gefäßbaumentwicklung in der reninzellspezifischen Vhl-Knockout-

Maus

Da HIF bekanntermaßen die Transkriptionsrate des Vascular-Endothelial-Growth-Faktor-Proteins erhöht sowie dessen mRNA auch posttranskriptionell reguliert und Vascular-Endothelial-Growth-Faktor ein wichtiger Faktor für die Angiogenese ist, wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob der Genotyp $Vhl^{-/-REN}$ hinsichtlich der Morphologie seines Gefäßbaumes Besonderheiten aufweist.

Unter Normalbedingungen konnten zwischen den Gefäßbaumteilrekonstruktionen des $Vhl^{-/-REN}$ - und des $Vhl^{fl/fl}$ -Tiers rein optisch keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Architektur des Gefäßbaums festgestellt werden. Die Gefäßbaumteilrekonstruktionen schienen sich sowohl im Ganzen (Abb. 3.24 und 3.25) als auch bei gezielter Betrachtung einander entsprechender Ausschnitte (Abb. 3.26 und 3.27) hinsichtlich Aufbau und Struktur des Gefäßbaums grundsätzlich zu entsprechen.

Es fanden sich weder bemerkenswerte Unterschiede hinsichtlich der Beziehung der Gefäßbäume zu angrenzenden Strukturen, wie Glomeruli oder Kapsel (Abb. 3.24 und 3.26), noch hinsichtlich des Aufbaus des Gefäßsystems selbst (Abb. 3.25 und 3.27).

Auch nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril fanden sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gefäßbaumteilrekonstruktionen des $Vhl^{-/-REN}$ - und des $Vhl^{fl/fl}$ -Tieres. Jedoch fiel in der Gefäßbaumteilrekonstruktion des $Vhl^{-/-REN}$ -Tieres eine ungewöhnlich starke Verästelung auf Höhe der Aa. interlobulares auf. Diese untergliederten sich zum Teil zweifach (interlobulärer Hauptast bzw. -stamm, interlobulärer Seitenast und interlobulärer Unterast), ehe schließlich die afferenten Arteriolen abgingen (Abb. 3.28 –3.31).

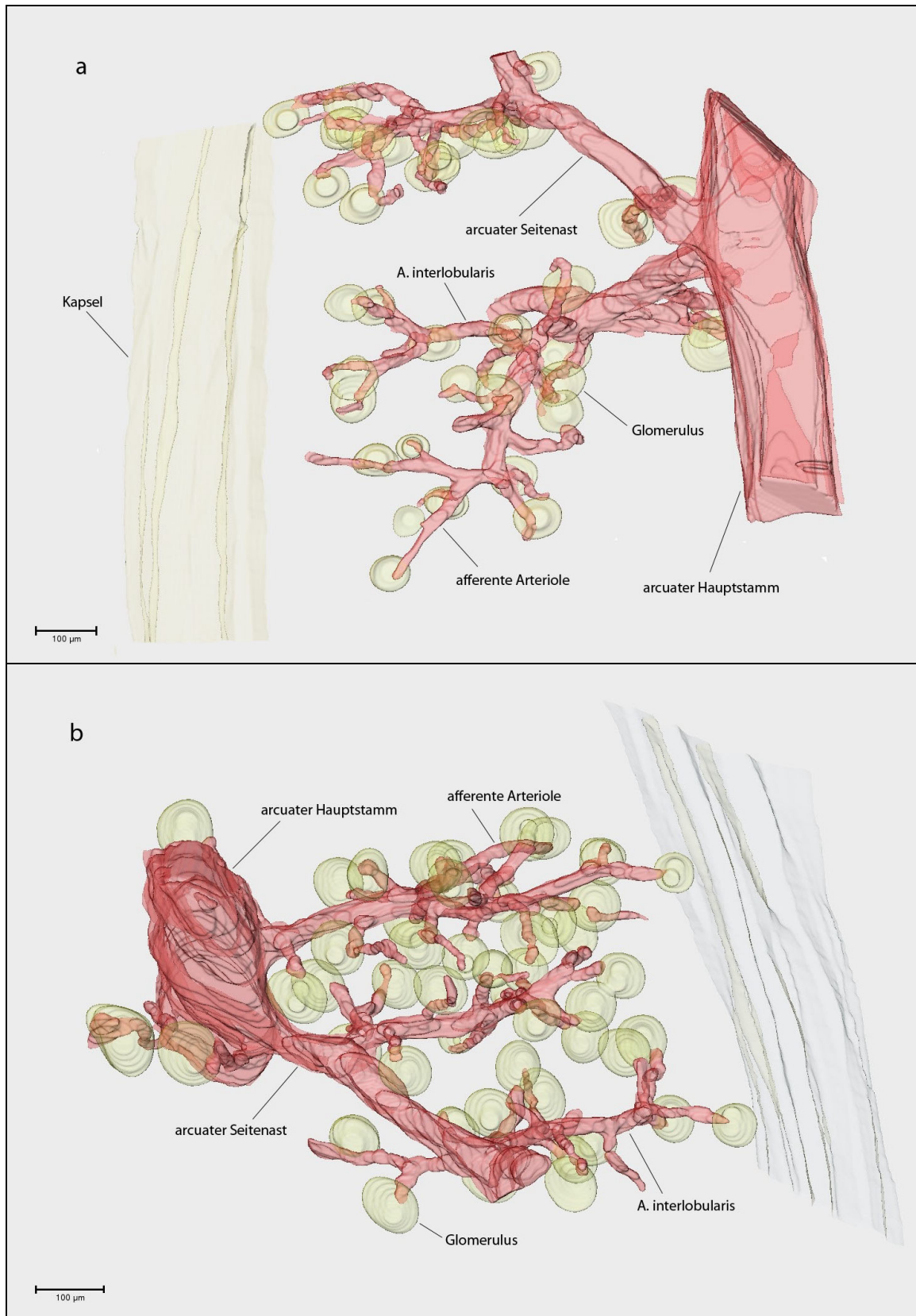


Abb. 3.24 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktion einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b). Die Tiere wuchsen unter Normalbedingungen auf. Dargestellt sind jeweils die Gefäßwand in Rot und die Glomeruli sowie die Kapsel in Gelb. Die Skala gibt 100 μm an.

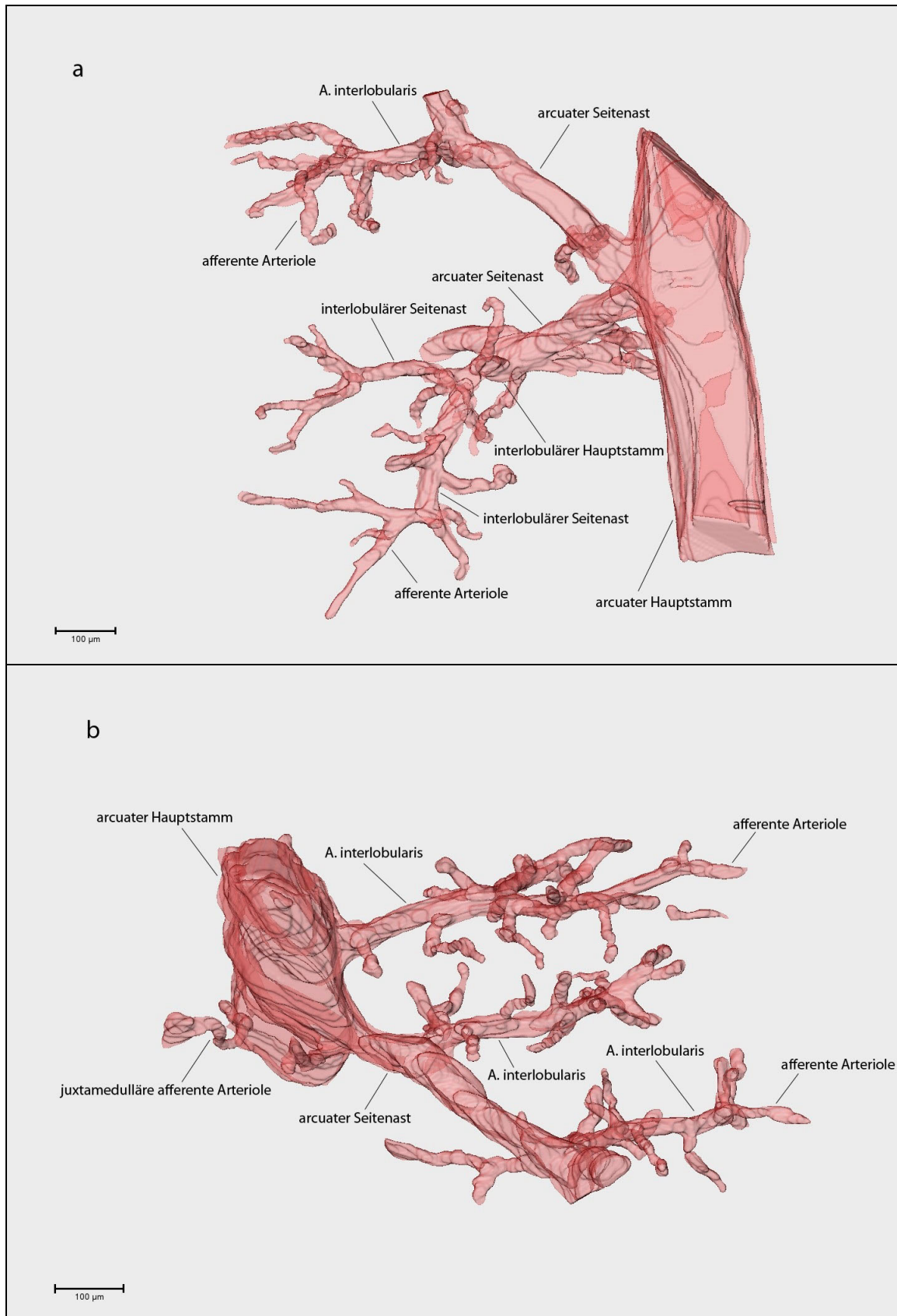


Abb. 3.25 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktion einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b). Die Tiere wuchsen unter Normalbedingungen auf. Dargestellt wird nur die Gefäßwand. Die Skala gibt jeweils 100 μm an.

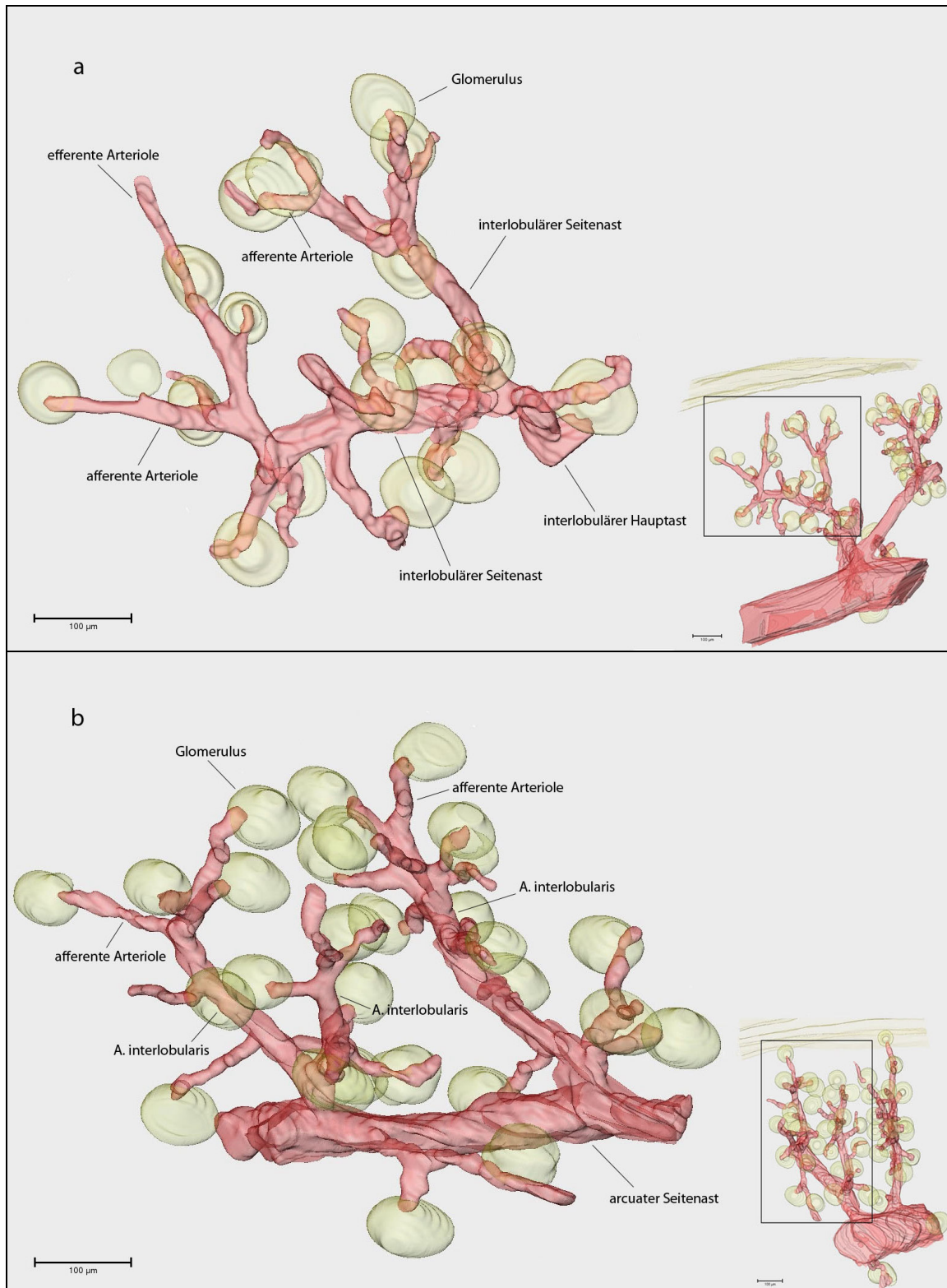


Abb. 3.26 Ausschnitte aus den Gefäßbaumteilrekonstruktionen einer *Vhl^{fl/fl}*-Maus (a) und einer *Vhl^{-/-REN}*-Maus (b). Dargestellt sind zwei interlobuläre Seitenäste mit einem Abschnitt des interlobulären Hauptastes (a) bzw. zwei interlobuläre Arterien mit einem Teilanschnitt des arcuaten Seitenastes (b). Die Markierungen in der jeweils rechts unten eingefügten Graphik zeigen die Lokalisation des Ausschnitts in der Rekonstruktion (vgl. Abb. 3.24). Die Skala gibt jeweils 100µm an.

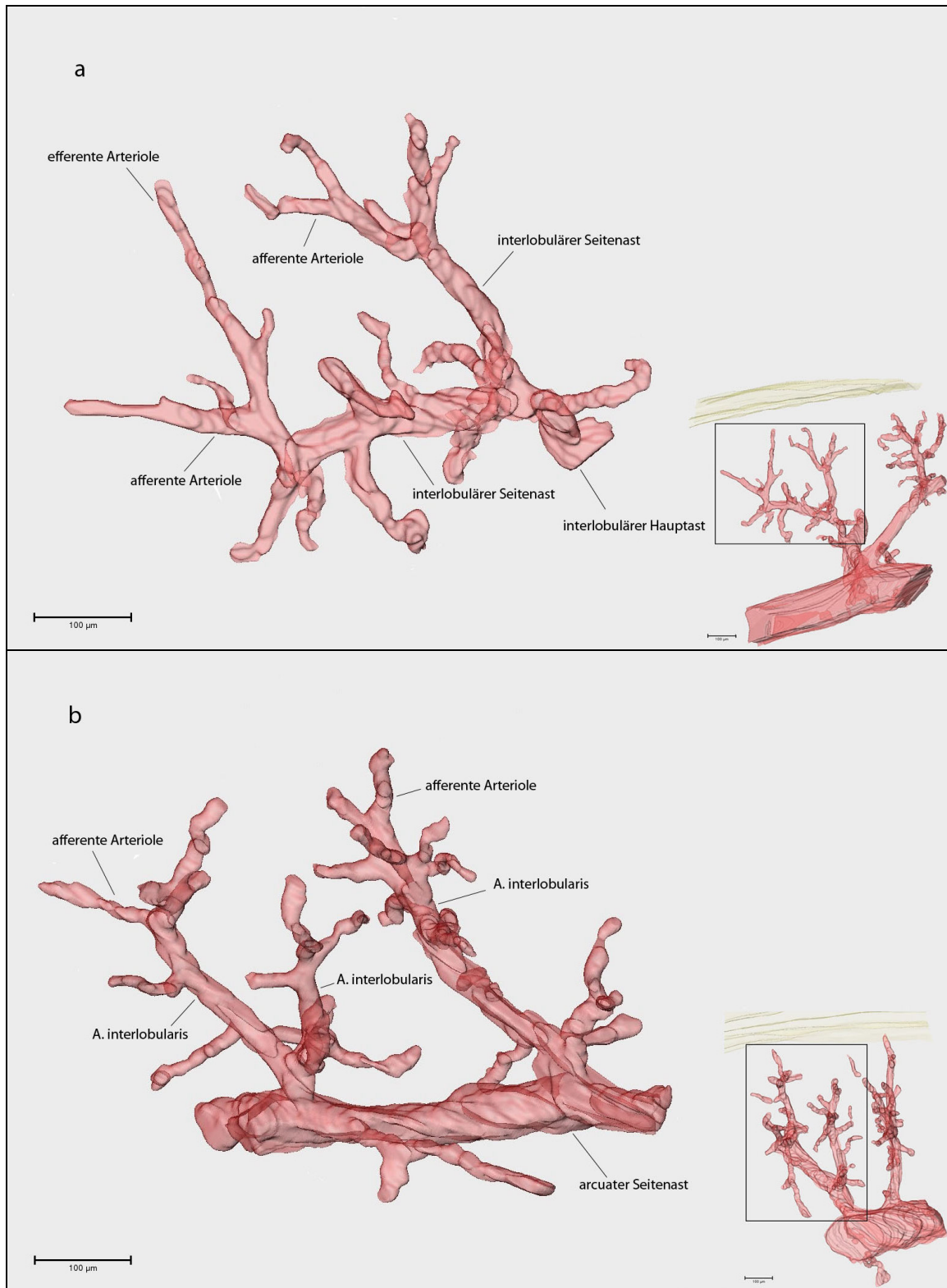


Abb. 3.27 Ausschnitte aus den Gefäßbaumteilrekonstruktionen einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b). Dargestellt sind zwei interlobuläre Seitenäste mit einem Abschnitt des interlobulären Hauptastes (a) bzw. zwei interlobuläre Arterien mit einem Teilanschnitt des arcuaten Seitenastes (b). Die Markierungen in der jeweils rechts unten eingefügten Graphik zeigen die Lokalisation des Ausschnitts in der Rekonstruktion (vgl. Abb. 3.25). Die Skala gibt jeweils 100µm an.

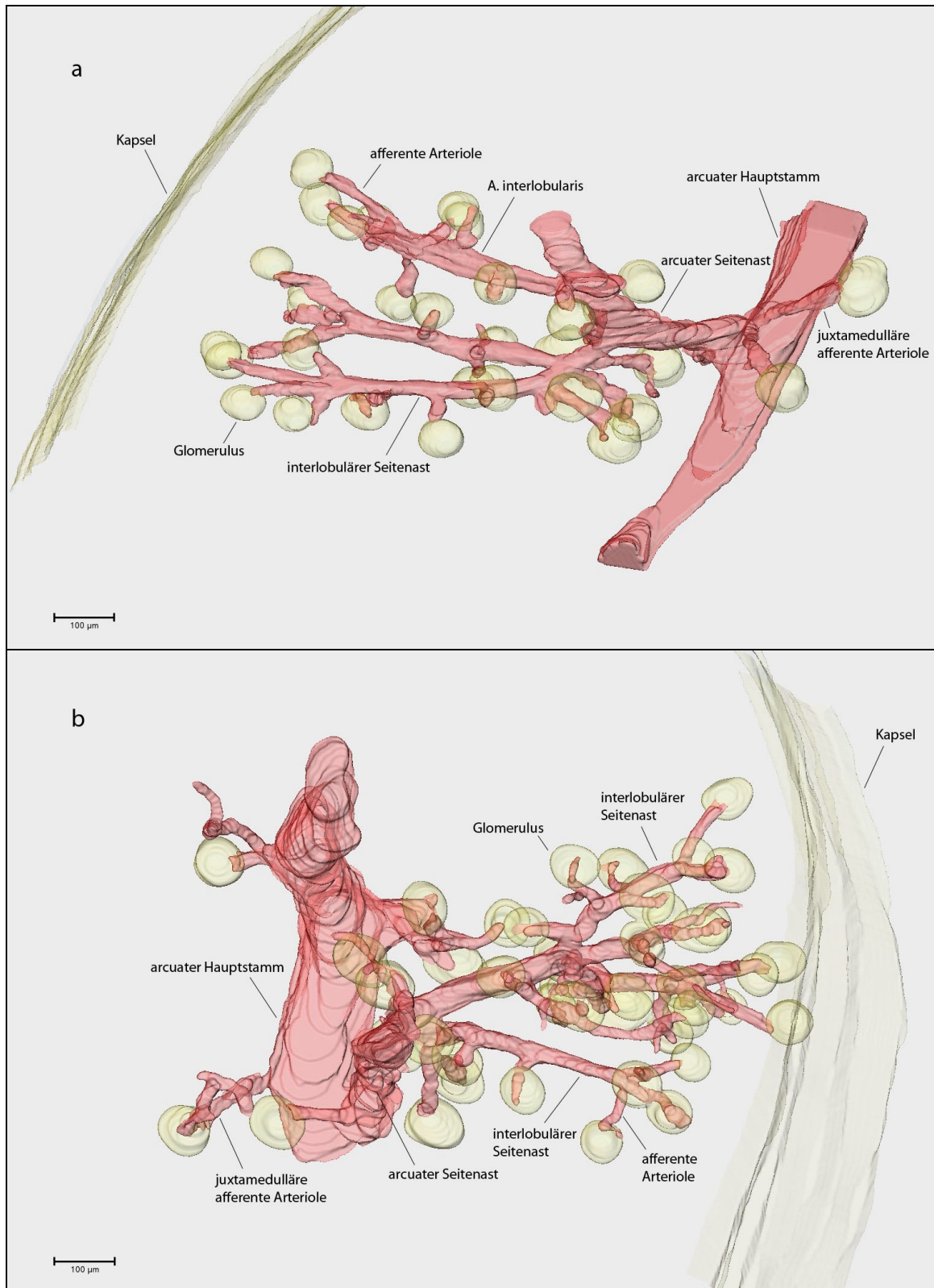


Abb. 3.28 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktion einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Das RAAS der Tiere wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen stimuliert. Dargestellt sind jeweils die Gefäßwand in Rot und die Glomeruli sowie die Kapsel in Gelb. Die Skala gibt 100 μm an.

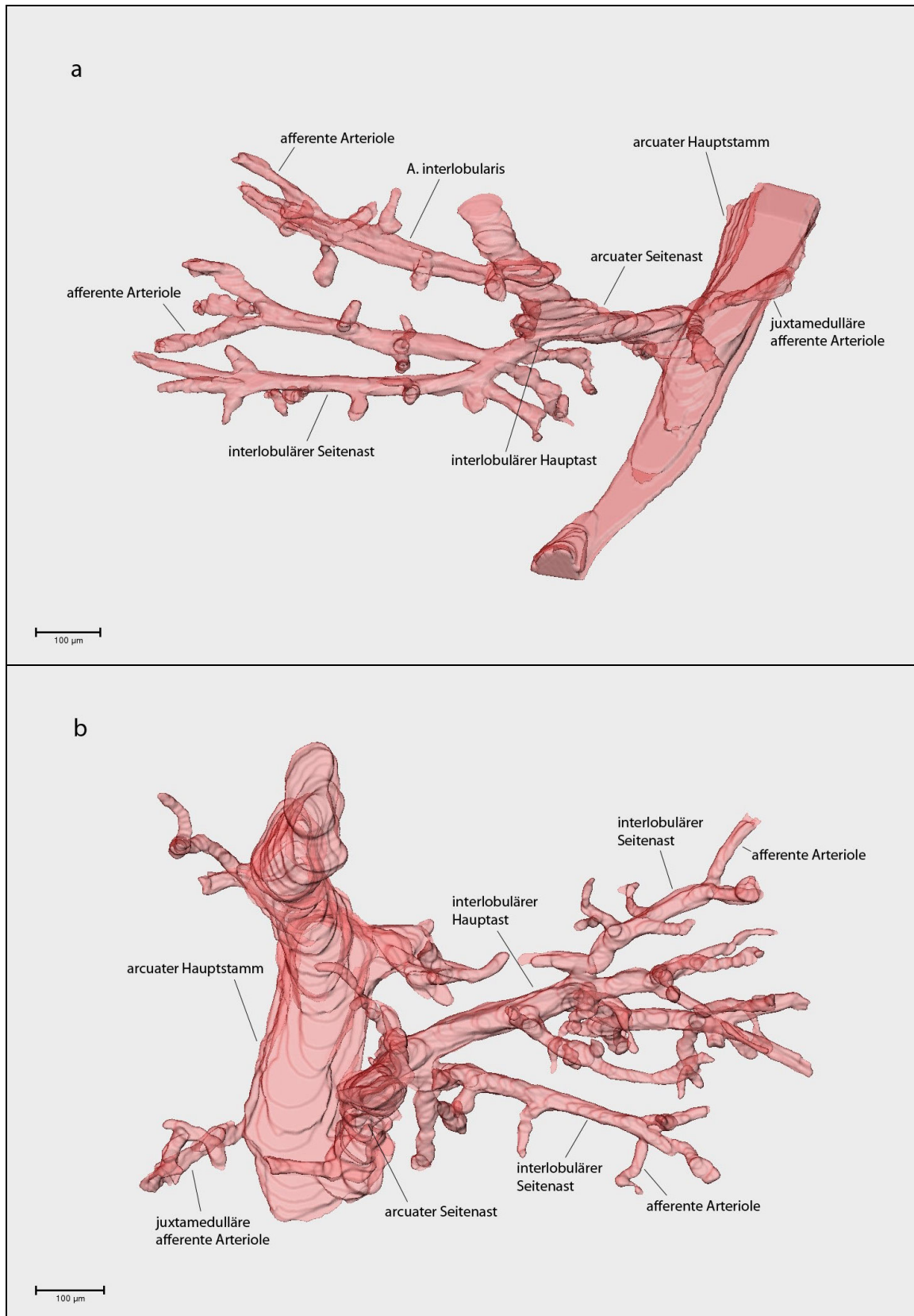


Abb. 3.29 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktion einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Das RAAS der Tiere wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen stimuliert. Dargestellt ist nur die Gefäßwand. Die Skala gibt jeweils 100µm an.

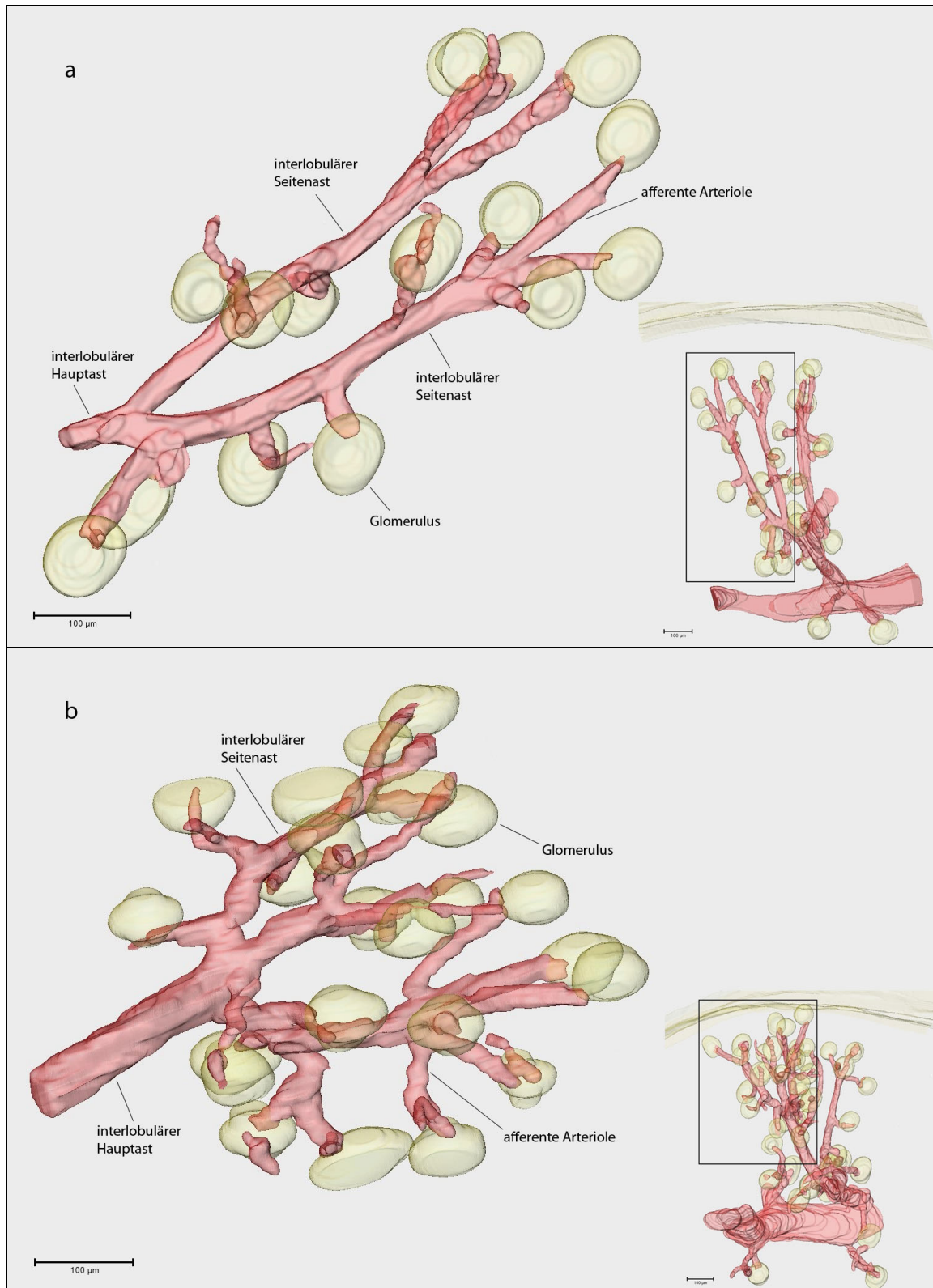


Abb. 3.30 Ausschnitte aus den Gefäßbaumteilrekonstruktionen einer *Vhl^{fl/fl}*-Maus (a) und einer *Vhl^{-/-REN}*-Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt eines interlobulären Hauptastes mit seinen Verästelungen. Das RAAS der Tiere wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen stimuliert. Die Markierungen in der jeweils rechts unten eingefügten Graphik zeigen die Lokalisation des Ausschnitts in der Rekonstruktion (vgl. Abb. 3.28). Die Skala gibt jeweils 100µm an.

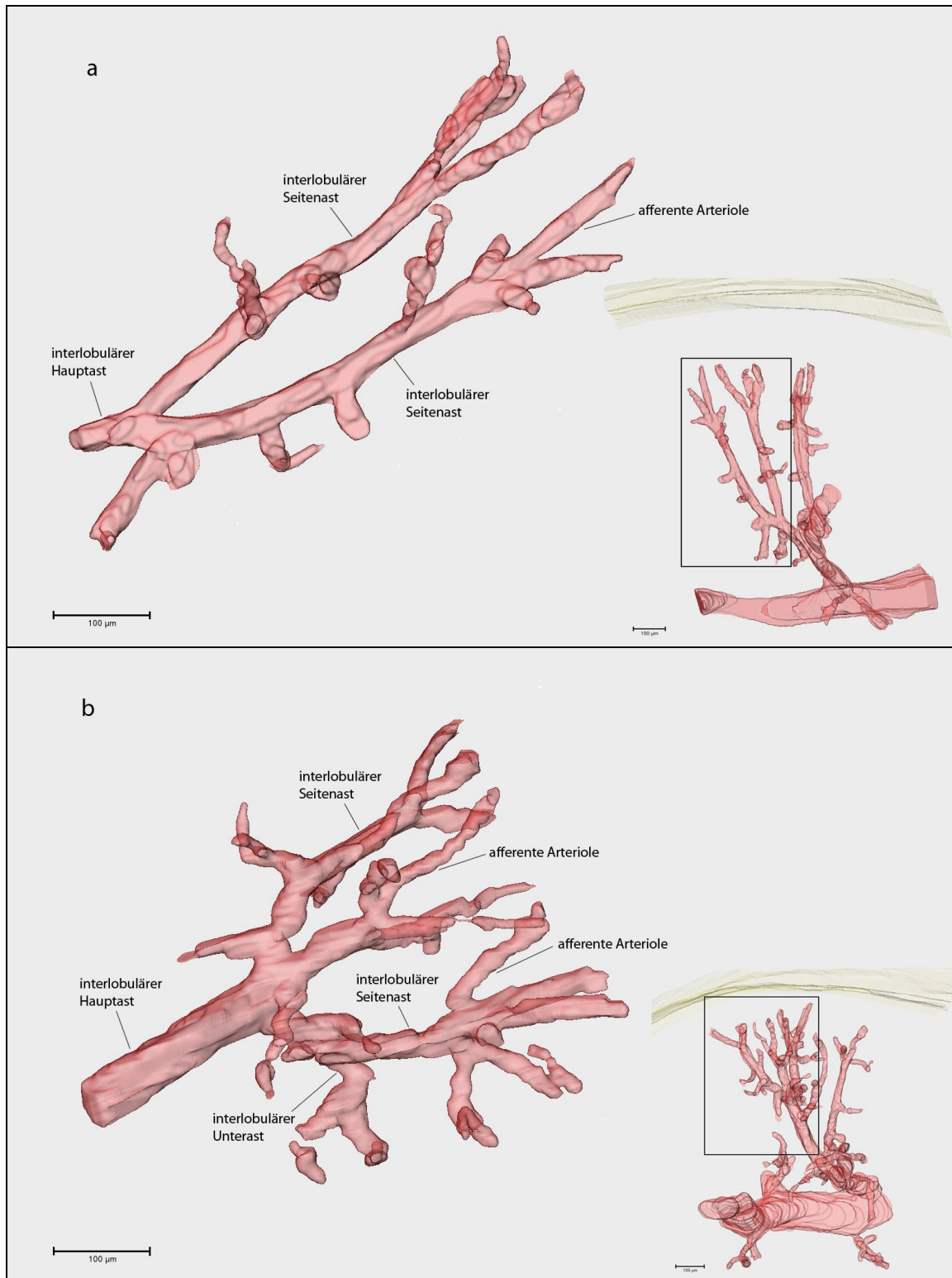


Abb. 3.31 Ausschnitte aus den Gefäßbaumteilrekonstruktionen einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril. Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt eines interlobulären Hauptastes mit seinen Verästelungen. Das RAAS der Tiere wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen stimuliert. Die Markierungen in der jeweils rechts unten eingefügten Graphik zeigen die Lokalisation des Ausschnitts in der Rekonstruktion (vgl. Abb. 3.29). Die Skala gibt jeweils 100µm an.

Mit Hilfe des Rekonstruktionsprogramms Amira wurden Vermessungen der rekonstruierten Gefäßbäume durchgeführt. Es wurde sowohl der durchschnittliche Durchmesser der afferenten Arteriolen in ihrem Verlauf (Abb. 3.32) als auch deren durchschnittliche Länge bestimmt (Abb. 3.33).

Durchschnittlicher Durchmesser der afferenten Arteriolen in μm

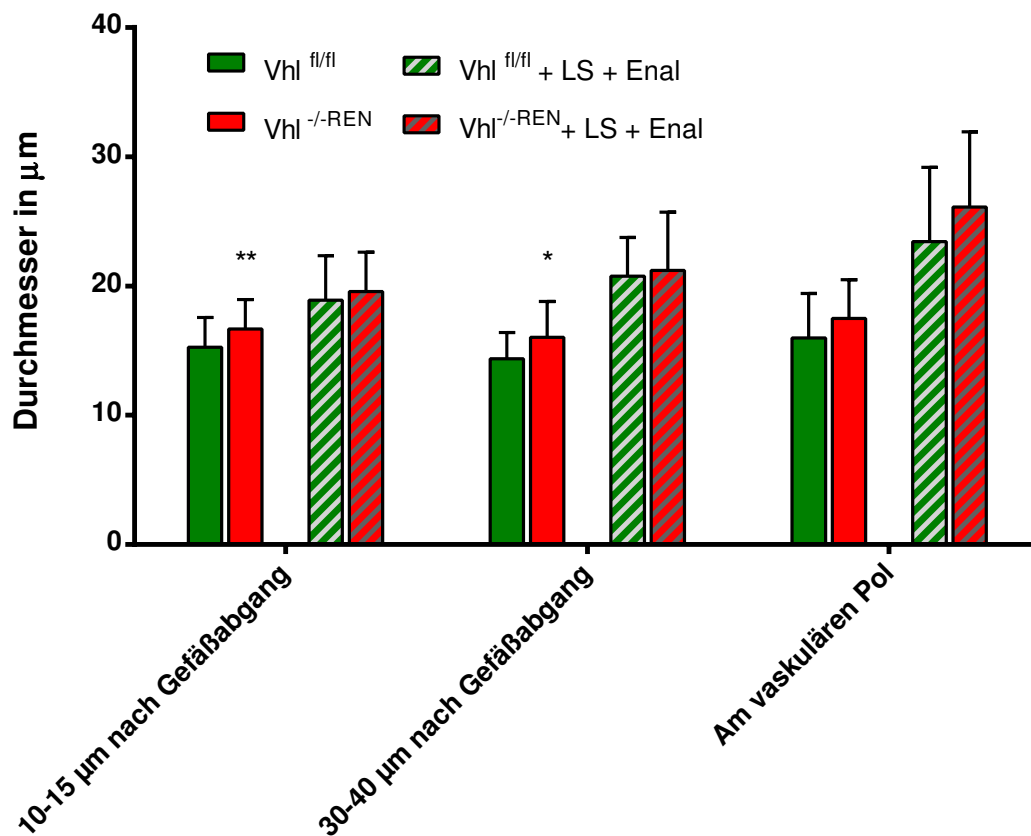


Abb. 3.32 Durchschnittlicher Durchmesser der afferenten Arteriolen

Der Durchmesser wurde jeweils an drei verschiedenen Stellen im Verlauf der afferenten Arteriolen bestimmt: 10-15 μm sowie 30-40 μm nach dem Abgang der afferenten Arteriole und jeweils im Bereich des vaskulären Pols. Pro Genotyp wurden jeweils unter Normalbedingungen bzw. nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril ca. 30-50 afferente Arteriolen vermessen. LS + Enal = Fütterung einer Nidrigsalzdiät und Gabe des ACE-Hemmers Enalapril über einen Zeitraum von 3 Wochen. Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung (SD) der Werte an. Sterne markieren signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten.

* markiert $p < 0,05$; ** markiert $p < 0,01$.

Um den durchschnittlichen Durchmesser der afferenten Arteriolen zu bestimmen, erfolgten Vermessungen an jeweils drei verschiedenen Stellen im Verlauf der afferenten Arteriole: Gemessen wurde jeweils 10-15µm sowie 30-40µm nach Abgang der afferenten Arteriole aus dem jeweiligen interlobulären Gefäß. Außerdem wurde der Durchmesser der afferenten Arteriole im Bereich des vaskulären Pols bestimmt. Gemessen wurde jeweils der äußere Durchmesser des Gefäßes anhand der für die Rekonstruktionen verwendeten Gewebeschnitte. Pro rekonstruiertem Gefäßbaum wurden ca. 30-50 afferente Arteriolen vermessen.

Sowohl für den Genotyp $Vhl^{fl/fl}$ als auch für den Genotyp $Vhl^{-/-REN}$ zeigte sich, dass der Durchmesser der afferenten Arteriolen nach Stimulation des RAAS etwas größer war als unter Normalbedingungen (im Verlauf der Gefäße rund 14-18µm unter Normalbedingungen, rund 19-26µm nach Stimulation des RAAS). Außerdem schien der Durchmesser der afferenten Arteriolen nach Stimulation des RAAS mit dem Verlauf des Gefäßes in Richtung vaskulärer Pol leicht zuzunehmen. Dies war unter Normalbedingungen nicht der Fall.

Unter Normalbedingungen fanden sich zwischen Knockout- und Kontrolltier signifikante Unterschiede hinsichtlich des Durchmessers der afferenten Arteriolen und zwar sowohl 10-15µm nach Abgang der afferenten Arteriole ($15,26 \pm 0,39 \mu m Vhl^{fl/fl}$ bzw. $16,67 \pm 0,33 \mu m Vhl^{-/-REN}$; $p = 0,0069$), als auch 30-40µm nach deren Abgang ($14,37 \pm 0,48 \mu m Vhl^{fl/fl}$ bzw. $16,02 \pm 0,52 \mu m Vhl^{-/-REN}$; $p = 0,0333$). Im Bereich des vaskulären Pols fanden sich hingegen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Durchmessers der afferenten Arteriolen ($15,98 \pm 0,53 \mu m Vhl^{fl/fl}$ bzw. $17,51 \pm 0,53 \mu m Vhl^{-/-REN}$; $p = 0,0533$).

Nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril konnten zwischen Knockout- und Kontrolltier keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Durchmessers der afferenten Arteriolen festgestellt werden (Abb. 3.32).

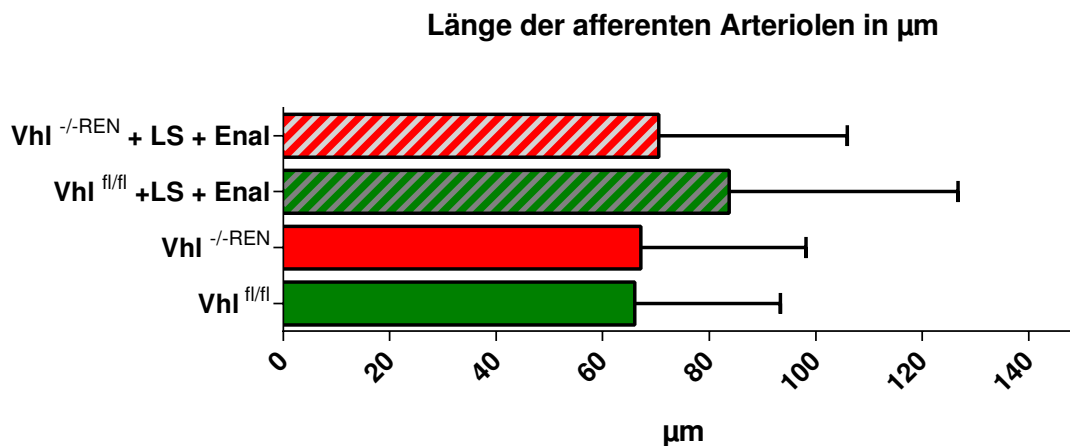


Abb. 3.33 Durchschnittliche Länge der afferenten Arteriolen in μm .

Pro Genotyp wurden jeweils unter Normalbedingungen sowie nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril ca. 30-50 afferente Arteriolen vermessen. Juxtamedulläre afferente Arteriolen wurden bei der Vermessung nicht berücksichtigt. Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung (SD) der Werte an. LS + Enal = Fütterung einer Nidrigsalzdiät und Gabe des ACE-Hemmers Enalapril über einen Zeitraum von 3 Wochen.

Um die durchschnittliche Länge der afferenten Arteriolen zu ermitteln, wurden pro rekonstruiertem Gefäßbaum ca. 30-50 afferente Arteriolen vermessen. Juxtamedulläre afferente Arteriolen wurden aufgrund ihrer überdurchschnittlichen Länge in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Sowohl für den Genotyp Vhl^{fl/fl} als auch für den Genotyp Vhl^{-/-REN} ergab die Messung, dass die afferenten Arteriolen nach Stimulation des RAAS durchschnittlich etwas länger waren. Insgesamt jedoch schwankte die Länge der afferenten Arteriolen auch innerhalb der jeweiligen Rekonstruktionen stark, wie an den langen Fehlerbalken in Abb. 3.33 erkannt werden kann. Hinsichtlich der durchschnittlichen Länge der afferenten Arteriolen konnte daher zwischen den vier Rekonstruktionen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,16$).

Somit finden sich unter Normalbedingungen sowie auch nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril weder bezüglich des Aufbaus des Gefäßbaumes noch hinsichtlich der Länge und des Durchmessers der afferenten Arteriolen bedeutende Unterschiede zwischen reninzellspezifischem Vhl-Knockout- und Kontrolltier.

4.Diskussion

4.1. Erläuterungen zum verwendeten Mausmodell

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des Hypoxia-inducible-factor (HIF) für die Entwicklung und Rekrutierung reninbildender Zellen untersucht. In Abwesenheit des von-Hippel-Lindau Proteins (VHLp) wird HIF α stabilisiert und der HIF-Transkriptionskomplex kann in Aktion treten (Maxwell et al., 1999; Jiang et al., 1996). Deshalb wurden in dieser Arbeit die Nieren von Mäusen, in deren reninexprimierenden Zellen das Gen für VHLp deletiert worden war, histologisch untersucht und nach einer von Sauter&Machura etablierten Methode 3D-Gefäßbaumteilkonstruktionen angefertigt (Sauter & Machura et al., 2008).

Da der globale Knockout des Vhl-Gens bereits in utero letal endet (Gnarra et al., 1997) und um die Bedeutung des Vhl-Gens speziell in reninexprimierenden Zellen beurteilen zu können, wurden reninzellspezifisch Vhl-defiziente Tiere untersucht. Bei diesen Tieren war das Gen für VHLp mittels des Cre-LoxP-Systems selektiv nur in reninexprimierenden Zellen ausgeschaltet worden (Kurt et al., 2013). Hervorgegangen waren diese aus Kreuzungen von Tieren, bei welchen beide Allele für das Vhl-Gen gefloxt waren (Haase et al., 2001), mit Tieren, welche heterozygot für das Cre-Rekombinase-Gen unter der Kontrolle des endogenen Ren-1d-Promotors waren (Sequeira Lopez et al., 2004). Für Tiere, welche heterozygot für das Ren-1d-Gen sind, kann eine normale basale Reninproduktion vorausgesetzt werden (Chen et al., 2007). Als Kontrolltiere wurden Vhl^{fl/fl}-Geschwistertiere der Knockouts untersucht.

In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass die Aktivität von FIH (Factor-inhibiting-HIF) im untersuchten Mausmodell keine wesentliche Rolle spielt. Da in den Vhl-defizienten Zellen normoxische Verhältnisse herrschen dürften, müsste FIH dort aktiv sein und durch Hydroxylierungen an Asparaginresten der HIF α -Untereinheiten die Interaktion des HIF-Transkriptionskomplexes mit Cofaktoren wie p300/CBP beeinträchtigen. Es ist jedoch anzunehmen, dass durch den VHLp-Verlust die Konzentration an HIF α in den Zellen so groß ist, dass FIH nur einen kleinen Teil der HIF α -Untereinheiten hydroxylieren kann und somit noch ausreichend nicht-hydroxylierte

HIF α -Untereinheiten zur Verfügung stehen (Lando et al., 2002). Zudem scheint der FIH-Regulationsmechanismus im Vergleich zum PHD-VHLp-Weg nur eine geringe Rolle zu spielen und eher der Feinregulation der HIF-Aktivität zu dienen (Stolze et al., 2004).

4.2. Vergleich der histologischen Befunde mit molekularbiologischen Befunden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass in reninzellspezifisch Vhl-defizienten Mäusen die Anzahl reninpositiver Zellen im Gefäßbaum deutlich reduziert war. Zudem waren die Zellen morphologisch durch ihre Feinheit und histologisch durch ihre schwächere immunhistochemische Anfärbbarkeit auffällig. Die reninpositiven Zellen dieser Tiere waren häufig nicht in der typischen juxtaglomerulären Position anzufinden, sondern abnormal lokalisiert und weiter stromaufwärts im Gefäßbaum angesiedelt. In all diesen Punkten war der Unterschied zwischen Knockout- und Kontrolltier nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzfutter und Enalapril noch gravierender. Eine gewisse Fähigkeit zur Rekrutierung in Reaktion auf eine Stimulation des RAAS war den Knockout-Tieren erhalten geblieben. Jedoch erfolgte die Rekrutierung zum Teil ungewöhnlich weit stromaufwärts in den Gefäßbaum hinein, wohingegen knapp 50% der afferenten Arteriolen gänzlich frei von reninpositiven Zellen blieben. Auffällig war die häufige Lokalisation reninpositiver Zellen im Bereich von Gefäßabgängen und -gabelungen.

Dass die Abundanz reninexprimierender Zellen in der reninzellspezifischen *Vhl*-Knockout-Maus deutlich verringert ist, wurde in dieser Arbeit mittels histologischer Methoden festgestellt. Bestätigt wurde dies durch molekularbiologische Analysen des Renin-mRNA-Gehaltes des Nierengewebes sowie Messungen der Plasmapreninkonzentration in *Vhl*^{-/-REN}-Tieren in unserem Labor (Abb. 4.1) (Kurt et al., 2013).

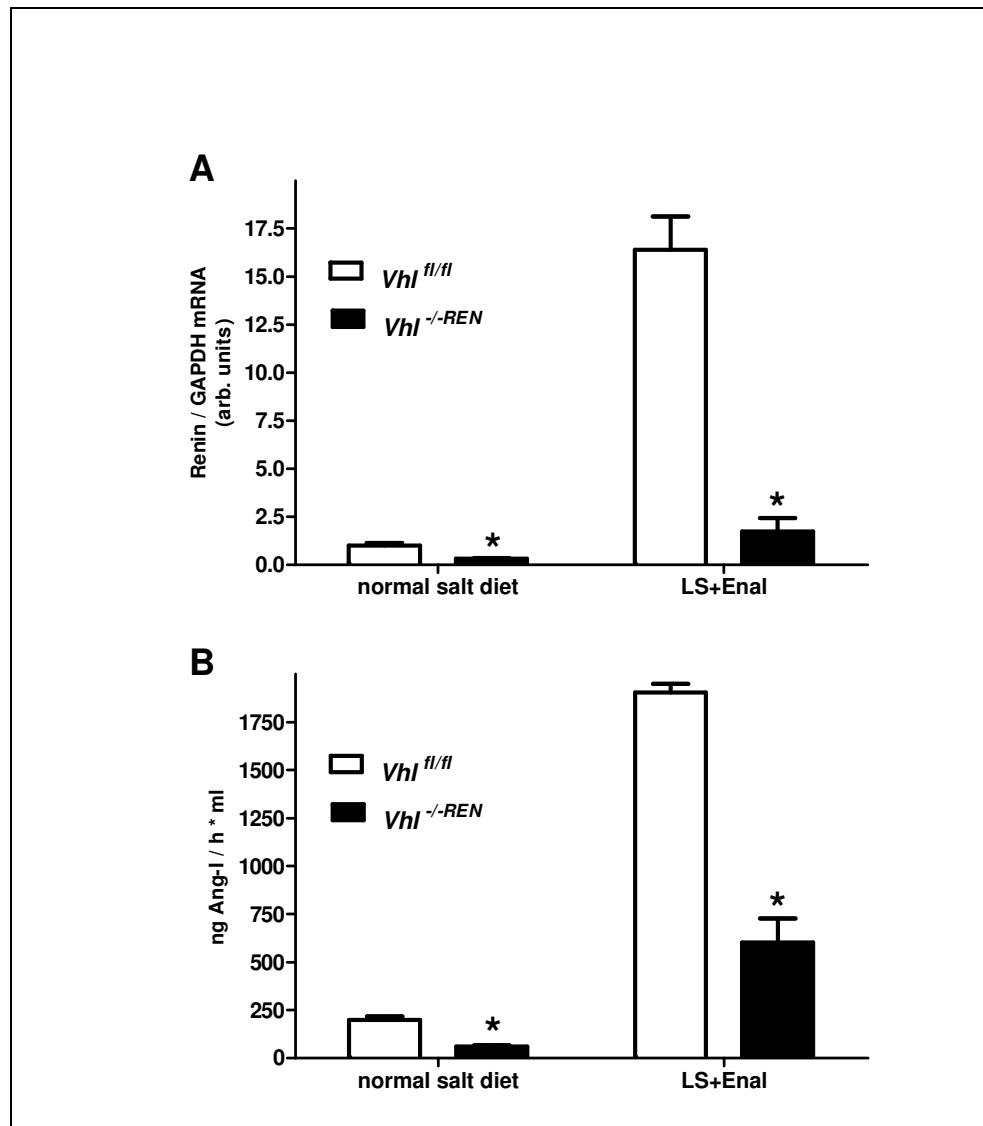


Abb. 4.1 Renin-mRNA-Konzentrationen in der Niere (A) und Plasmapreninkonzentrationen (B) in *Vhl*^{fl/fl}-Mäusen und *Vhl*^{-/-REN}-Mäusen unter Normalbedingungen und nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril.

LS + Enal = Gabe einer Nidrigsalzdiät sowie des ACE-Hemmers Enalapril für 3 Wochen; Die Werte sind Mittelwerte ± SEM von je 10 Nieren pro Versuchsgruppe; * indiziert Signifikanz für $p < 0.05$.

Graphik und Daten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Birgül Kurt für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Das renale Renin-mRNA Verhältnis zwischen Kontrolltier und Knockout beträgt im basalen Zustand 1 : 0.31. Nach Stimulation des RAAS beträgt es 16.4 : 1.7, was einem Verhältnis von 1 : 0.10 entspricht. Somit wird beim Genotyp $Vhl^{-/-REN}$ sowohl unter Normalbedingungen als auch nach Stimulation des RAAS deutlich weniger Renin-mRNA exprimiert, als beim entsprechenden Kontrolltier.

Die Werte zur Renin-mRNA-Expression in den Nieren von Knockout und Kontrolle verhalten sich ähnlich wie die Werte zum Reninvolumen, welche aus den Gefäßbaumteilrekonstruktionen ermittelt wurden. Zur Erinnerung: Bei dem unter Normalbedingungen aufgewachsenen Pärchen war das Verhältnis des Reninvolumens zwischen Kontrolle und Knockout gleich 1 : 0.54, nach Stimulation des RAAS umgerechnet gleich 1 : 0.15 (in Originalwerten: 6,17 vs. 0.97).

Das Verhältnis der Renin-mRNA-Expression vor und nach Stimulation des RAAS ist für das Kontrolltier gleich 1 : 16.4, für das $Vhl^{-/-REN}$ -Tier umgerechnet gleich 1 : 5.5 (in Originalwerten: 0.31 vs. 1,7). Die Reaktion des $Vhl^{-/-REN}$ -Tiers auf die RAAS Stimulation erreicht somit nur rund ein Drittel des Ausmaßes, in welchem das Kontrolltier auf die Stimulation reagiert (16.4 : 5.5 verhält sich wie 3 : 1).

Das Verhältnis des Reninvolumens vor und nach Stimulation des RAAS ist für das Kontrolltier gleich 1 : 6.2, für das $Vhl^{-/-REN}$ -Tier umgerechnet gleich 1 : 1.8 (in Originalwerten: 0.54 vs. 0.97). Auch hier erreicht die Reaktion des $Vhl^{-/-REN}$ -Tiers auf die RAAS Stimulation nur rund ein Drittel des Ausmaßes, in welchem das Kontrolltier auf die Stimulation reagiert (6.2 : 1.8 verhält sich wie 3 : 1).

Ähnliche Verhältnisse spiegelt die Messung der Plasmareninkonzentration in den jeweiligen Tieren wieder. Unter Normalbedingungen ist hier das Verhältnis zwischen Kontrolle und $Vhl^{-/-REN}$ -Tier umgerechnet rund 1 : 0.3 (in Originalwerten: 198.4 vs. 59.8 ng Ang-I/h*ml). Auch nach Stimulation ist das Verhältnis umgerechnet rund 1 : 0.3 (in Originalwerten: 1903.1 vs. 602.6 ng Ang-I/h*ml). Somit beträgt die Plasmareninkonzentration der $Vhl^{-/-REN}$ -Tiere sowohl unter Normalbedingungen als auch nach Stimulation des RAAS nur rund ein Drittel der jeweiligen Konzentrationen der

Kontrolltiere. Hinsichtlich der Plasmapareninkonzentration entsprechen sich somit Knockout und Kontrolle in etwa im Ausmaß ihrer Reaktion auf die RAAS Stimulation.

Dass sich die Verhältniswerte zwischen Kontrolle und Knockout im basalen Zustand abhängig davon, ob sie aus den Werten der renalen Renin-mRNA-Abundanz (1 : 0.31) oder des Reninvolumens (1 : 0.54) bestimmt wurden, etwas unterscheiden, mag an Variabilitäten hinsichtlich der Sensibilität der unterschiedlichen Methoden liegen. Bei der Erstellung der Gefäßbaumteilrekonstruktionen kann nur das Vorhandensein und die räumliche Ausbreitung, nicht aber die Intensität der reninmarkierenden Signale erfasst werden. So wurden bei der Berechnung des Reninvolumens Signale, welche aufgrund einer nur geringen Renindichte schwächer emittierten - wie es bei den feineren und schmaler ausgeprägten reninpositiven Zellen des Knockouts teilweise der Fall war - gleichgesetzt mit stärkeren Signalen in Bereichen höherer Renindichte, sofern die Fläche der Signale dieselbe war. Somit könnten aus den Gefäßbaumteilrekonstruktionen falsch hohe Werte zugunsten des Knockout-Tieres berechnet worden sein.

Auffällig ist zudem, dass die Differenz zwischen Knockout und Kontrolle vor allem nach Stimulation des RAAS bei den Messungen zur Plasmapareninkonzentration geringer ist, als bei den Messungen der renalen Renin-mRNA Konzentration. Interessanterweise wurde bereits früh gezeigt, dass die Nieren-Renin-mRNA- und die Reninplasmakonzentration in Reaktion auf eine Stimulation des RAAS nicht proportional zueinander ansteigen (Nakamura et al., 1985). Dies mag verschiedene Gründe haben, beispielsweise sollte in diesem Zusammenhang bedacht werden, dass die mRNA Quantität nicht zwangsläufig mit der Menge des gebildeten Proteins korreliert. Vielmehr wird das Verhältnis dieser beiden Parameter zueinander zusätzlich durch andere Faktoren wie z.B. die Translationsrate der mRNA beeinflusst (Gygi et al., 1999; Huang et al., 2011). Gerade unter der Stressbedingung der Stimulation könnte das RAAS der Knockout-Mäuse sein Defizit an Renin-mRNA durch derartige Mechanismen zumindest teilweise kompensiert haben.

Zum Thema Abundanz und Morphologie reninexprimierender Zellen in der reninzellspezifisch Vhl-defizienten Maus lässt sich somit Folgendes festhalten: Die Abundanz reninpositiver Zellen ist im Vergleich zur Kontrolle sowohl unter Normalbedingungen als auch nach Stimulation des RAAS deutlich vermindert. Zudem weisen die reninbildenden Zellen der Vhl-/-REN-Tiere eine zartere Morphologie und eine schwächere Anfärbbarkeit für Renin auf. Dies scheint mit einer verminderten Reninexpression in den Zellen der Knockout-Tiere einherzugehen. Dafür sprechen nicht nur die Ergebnisse der Untersuchungen zum Reninvolumen, sondern auch molekularbiologische Untersuchungen zur Renin-mRNA-Konzentration im Nierengewebe der Knockout-Mäuse und deren Plasmapareninkonzentration.

4.3. Reninexpression in der reninzellspezifisch Vhl-defizienten Maus

Der Verlust des Vhl-Gens scheint die Reninexpression in unbekannter Weise negativ zu beeinflussen. Naheliegender wäre, dass hierbei der HIF-Signalweg involviert ist, denn dieser ist das derzeit wohl wichtigste bekannte zelluläre Signalsystem, das durch pVHL reguliert wird (Iliopoulos et al., 1996; Maxwell et al., 1999).

Eine Möglichkeit weshalb sich die Aktivierung des HIF-Signalwegs negativ auf die Reninexpression auswirken könnte wäre, dass Zielgene des HIF-Systems die Reninexpression direkt hemmen. Oder aber durch das HIF-System aktivierte Signalwege könnten mit der Reninexpression um Cofaktoren etc. konkurrieren und die Reninexpression käme somit zugunsten anderer zellulärer Abläufe zum Erliegen. Für HIF selbst wurde bisher nicht beschrieben, dass es Transkriptionsraten direkt negativ beeinflusst (Haase, 2006; Kurt et al., 2013).

An dieser Stelle kann derzeit nur spekuliert werden, da sowohl das Expressionsmuster als auch die Wirkweise der verschiedenen HIF α -Isoformen in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp und der dort vorhandenen lokalen Faktoren variieren (Aprelikova et al., 2006; Hu et al., 2007; Wenger et al., 2005; Haase, 2006; Kapitsinou et Haase, 2008; Patel et Simon, 2008).

In hypoxischem Gewebe überlappen sich die beiden Isoformen HIF1 α und HIF2 α in ihrer Expression zwar teilweise, prinzipiell unterscheiden sie sich jedoch in ihrem zeitlichen und räumlichen Auftreten (Stroka et al., 2001; Wiesener et al., 2003). Für das Nierengewebe wurde gezeigt, dass mit Ausnahme des Bereichs der Glomeruli pro Zelltyp jeweils nur eine der beiden HIF α -Isoformen exprimiert wird (Rosenberger et al., 2002). Interessanterweise verhält sich das räumliche Muster, in welchem die beiden Faktoren unter hypoxischen Bedingungen auftreten, ähnlich wie die Verteilung der HIF α -Isoformen während der Nierenentwicklung (Bernhardt et al., 2006). Da auch die Anwendung unterschiedlicher Stimuli, die in der Niere ein hypoxisches Milieu erzeugen bzw. dies suggerieren (z.B. CoCl₂), immer das gleiche Verteilungsmuster der beiden HIF α -Isoformen zur Folge hat, geht man davon aus, dass intrinsische Faktoren determinieren, welche HIF α -Isoform in der jeweiligen Zelle vorherrscht (Rosenberger et al., 2002).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Tieren wurde in den genetisch veränderten Vhl-defizienten reninexprimierenden Zellen des renalen Gefäßbaums eine Akkumulation von HIF2 α nachgewiesen (Kurt et al., 2013). HIF1 α hingegen wurde in diesen Zellen nicht detektiert, jedoch in Zellen des Sammelrohrs, wo bekanntermaßen während der Embryonalentwicklung der Reninpromotor aktiv ist (Castrop et al., 2006; Kurt et al., 2013). Im Nierengewebe der Kontrolltiere wurde keine der beiden HIF α -Isoformen gefunden (Kurt et al., 2013). Die Verteilung der beiden HIF α -Isoformen in den Nieren der reninzellspezifisch Vhl-defizienten Tiere steht in Einklang mit den Ergebnissen von Rosenberger et al. (Rosenberger et al., 2002). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass es in den Vhl-defizienten reninexprimierenden Zellen wie erwartet zu einer Aktivierung des HIF-Signalwegs gekommen ist. Unklar bleibt jedoch, inwiefern und ob überhaupt HIF2 α an der Ausprägung des beobachteten Phänotyps beteiligt ist.

Hypoxie wird für die Regulierung der zellulären Differenzierung eine wichtige Rolle zugesprochen (Genbacev et al., 1997; Morrison et al., 2000; Jögi et al., 2002). HIF α , speziell auch HIF2 α , scheint in verschiedenen Zell- und Gewebearten, wie beispielsweise Stammzellen, Neuroblastomzellen, Fettgewebe und Chondrozyten an der Regulierung von Differenzierungsvorgängen beteiligt zu sein (Covello et al., 2006; Forristal et al.,

2010; Jögi et al., 2002; Giraud-Triboult et al., 2010; Yun et al., 2002; Shimba et al., 2004; Cowden 2005; Lafont et al., 2007; Saito et al., 2010).

Interessanterweise wurde auch dem Vhl-Gen wiederholt eine Bedeutung für zelluläre Differenzierungsvorgänge zugeschrieben (Adryan et al., 2000; Davidowitz et al., 2001; Lieubeau-Teillet et al., 1998; Lutz et Burk, 2006). Ob oder inwiefern der HIF-Signalweg an der Regulierung solcher Differenzierungsvorgänge beteiligt ist, ist noch unklar. Bei Patienten, die an der Vhl-Krankheit leiden, wurde festgestellt, dass renale Zysten von Epithelien ausgekleidet werden, deren Genexpressionsmuster auf eine Dedifferenzierung dieser Zellen schließen lässt (Rankin et al., 2006; Esteban et al., 2006b). Ebenso wurde gezeigt, dass in präkanzerösen Vhl-defizienten renalen Läsionen solcher Patienten eine Herabregulierung des wichtigen Adhäsions- und Signalmoleküls E-Cadherin - wohl HIF vermittelt - auftritt (Esteban et al., 2006a), ein Ereignis, welches ebenfalls einen Verlust des zellulären Differenzierungsstatus zur Folge haben könnte.

Es muss somit in Betracht gezogen werden, dass ein Verlust des Vhl-Gens – HIF-vermittelt oder HIF-unabhängig - mit einer De- bzw. Umdifferenzierung der betroffenen Zellen einhergehen könnte. Dies könnte sich entweder in einer Dedifferenzierung hin zu einem Vorläuferzelltyp oder aber in einer Umdifferenzierung zu einem anderen Zelltypen äußern.

Hinsichtlich einer eventuellen Rolle des HIF-Signalsystems bei der Regulierung zellulärer Differenzierungszustände müssen neben dem klassischen HIF-Signalweg, bei welchem ein Heterodimer aus HIF α und HIF β als Transkriptionskomplex agiert, auch alternative Wirkweisen von HIF α berücksichtigt werden. Dies ist ein Feld, welches erst im Begriff ist erforscht zu werden (Greer et al., 2012; Patel et Simon, 2008; Kapitsinou et Haase, 2008). So sind beispielsweise HIF α vermittelte Interaktionen des HIF-Systems mit anderen Signaltransduktionssystemen bekannt, welche eine Rolle im Bereich der Zelldifferenzierung spielen, wie beispielsweise mit dem Notch-Signalweg (Gustafsson et al., 2005; Chen et al., 2010; Pistollato et al., 2010; Greer et al., 2012). Ebenso wurde ein Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktorfamilien, wie beispielsweise der Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren, beschrieben, die ebenfalls an der Regulierung von

Zellproliferation und –differenzierung beteiligt sind (Oikawa et al., 2001; Elvert et al., 2003; Aprelikova et al., 2006; Hu et al., 2007; Patel et Simon, 2008).

An Vhl-defizienten Zelllinien renaler Karzinome wurde gezeigt, dass ein zusätzlicher Knockdown von HIF2 α nicht zu einer Redifferenzierung der Zellen führte. Das Einfügen eines funktionstüchtigen Vhl-Gens hingegen hatte eine solche Redifferenzierung zur Folge (Hughes et al., 2007). Davidowitz et al. sahen einen Zusammenhang zwischen der Rolle des Vhl-Gens für die Zelldifferenzierung und Zell-Zell- bzw. Zell-Matrixkontakten (Davidowitz et al., 2001; Lieubeau-Teillet et al., 1998).

Somit dürfen auch HIF-unabhängige Wirkweisen des Vhl-Gens als Faktoren für das Zustandekommen des in diesem Mausmodell beobachteten Phänotyps nicht vergessen werden. HIF-unabhängig ist pVHL wohl unter anderem beteiligt an der Kontrolle der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Ohh et al., 1998; Bishop et al., 2004; Stickle et al., 2004; Kurban et al., 2006; Tang et al., 2006; Hughes et al., 2007) und an der Regulierung der Mikrotubuli des Zytoskeletts (Hergovich et al., 2003; Lolkema et al., 2004; Schermer et al., 2006; Kaelin, 2008; Kapitsinou et Haase, 2008).

Beide dieser Bereiche sind interessant im Hinblick auf den in dieser Arbeit beobachteten Phänotyp. So könnte beispielsweise die ungewöhnlich zarte Form der reninexprimierenden Zellen nach Vhl-Verlust auch Ausdruck einer gestörten Zellarchitektur sein. Andererseits spielt die extrazelluläre Matrix eine Rolle bei der Regulierung zellulärer Differenzierungsvorgänge (Lukashev et Werb, 1998). Dies ist neben der Regulation des HIF-Systems ein weiterer möglicher Wirkmechanismus, über welchen pVHL an der Regulierung des Differenzierungsstatus von Zellen beteiligt sein könnte (Ohh et al., 1998; Davidowitz et al., 2001). Auch ein funktionstüchtiges und intakt reguliertes Zytoskelett ist wichtig für eine korrekte zelluläre Differenzierung. Im Zusammenhang mit fehlendem oder defektem pVHL wurde von Störungen in der Polarität von Epithelzellen, in der Orientierung des Wachstums von Mikrotubuli, sowie in der Ausbildung des primären Ziliums berichtet und zugleich über Störungen der

zellulären Differenzierung spekuliert (Lolkema et al., 2004; Lutz et Burk, 2006; Schermer et al., 2006; Thoma et al., 2007; Hughes et al., 2007).

Um besser zwischen HIF-abhängigen und HIF-unabhängigen Konsequenzen des Vhl-Verlustes in den reninexprimierenden Zellen unterscheiden zu können, werden in unserem Labor derzeit Untersuchungen an Vhl-HIF2 α -Doppelknockout-Mäusen vorgenommen.

Im Zusammenhang mit Spekulationen über den Einfluss eines Vhl-Genverlustes auf den zellulären Differenzierungsstatus sind Ergebnisse unseres Labors interessant, die zeigen, dass die Vhl-Defizienz in den reninexprimierenden Zellen des renalen Gefäßbaums mit einer Expression von Erythropoietin (EPO) einherging (Kurt et al., 2013). Die EPO-Expression wurde auf eine Stimulation des RAAS hin reaktiv gesteigert. Auch wiesen die betroffenen Mäuse eine deutliche Polyzythämie auf (Kurt et al., 2013).

Einst war die Bedeutung des HIF-Systems für die Regulierung der EPO-Expression Anlass für dessen Entdeckung (Semenza et Wang, 1992) und bis heute brachten zahlreiche Studien die Kontrolle der EPO-Expression insbesondere in Zusammenhang mit HIF2 (=HIF2 α und HIF β) (Rosenberger et al., 2002; Warnecke et al., 2004; Scortegagna et al., 2005; Chavez et al., 2006; Rankin et al., 2007; Gruber et al., 2007; Weidemann et Johnson, 2009). Ebenso wurde bereits früh ein Zusammenhang zwischen dem RAAS und der Produktion von EPO in der Niere vermutet (Fisher et al., 1967) und durch neuere Studien bestätigt (Kato et al., 2005).

Dass ein Verlust des Vhl-Gens in den reninexprimierenden Zellen des renalen Gefäßbaums eine Expression von EPO zur Folge hat, ist dennoch erstaunlich. Derzeit wird davon ausgegangen, die interstitiellen EPO-exprimierenden Zellen der Niere seien Abkömmlinge der Neuralleiste (Obara et al., 2008), während Foxd1 positive Zellen als Vorläuferzellen der reninexprimierenden Zellen des renalen Gefäßbaums gelten (Sequeira Lopez et Gomez, 2011). Somit nimmt man derzeit für diese beiden Zelltypen keine gemeinsame Vorläuferzelle an. Möglich wäre es jedoch, dass die

reninexprimierenden Zellen des renalen Gefäßbaums im Laufe ihrer Entwicklung oder unter bestimmten Umständen auch EPO exprimieren (Kurt et al., 2013). Die Tatsache, dass sich Renin- und EPO-Expression in den jeweiligen Zellen gegenseitig nahezu ausschließen (Kurt et al., 2013), lässt vermuten, dass der Vhl-Genverlust eine gewisse Umdifferenzierung der reninexprimierenden Zellen zur Folge hat.

Dann stellt sich jedoch die Frage, weshalb der Beginn der Reninexpression und die damit verbundene Expression der Cre-Rekombinase nicht schon im Embryonalstadium ein Erliegen der Renin- zugunsten einer EPO-Expression zur Folge hatte. Vielmehr finden sich auch im renalen Gefäßbaum des adulten $Vhl^{-/-REN}$ -Tiers neben EPO-exprimierenden Zellen noch solche, die Renin exprimieren. Eine mögliche Erklärung wäre, dass das Cre-LoxP-System im Rahmen dieser Studie erst mit einer gewissen Verzögerung seine vollständige Wirkung entfaltet hat. So könnte die Konzentration an Cre-Rekombinase in den Zellen zu Beginn der embryonalen Reninexpression noch zu gering gewesen sein, um eine sofortige Exzision des Vhl-Gens aus dem zellulären Genom zu bewirken. Je öfter jedoch das Reningen mit der Zeit abgelesen wird, desto größer wird die Aktivität der Cre-Rekombinase in den Zellen und damit auch die Wahrscheinlichkeit, dass das gefloxtete Vhl-Gen homozygot aus dem Genom entfernt wird. In den $Vhl^{-/-REN}$ -Tieren läge somit ein Mosaik aus Vhl-defizienten, ehemals reninexprimierenden Zellen und aus reninexprimierenden Zellen, in welchen der Verlust des Vhl-Gens noch nicht stattgefunden hat, vor. Dies würde ebenfalls erklären, weshalb bei den Tieren eine Stimulation des RAAS sowohl eine Steigerung der Renin- als auch der EPO-Expression (Kurt et al., 2013) bewirkt. Es wäre interessant, diese Theorie durch eine Analyse von Gefäßbaumteilrekonstruktionen reninzellspezifisch Vhl-defizienter Mäuse in verschiedenen embryonalen und postnatalen Entwicklungsstadien zu überprüfen.

Ein verzögerter Eintritt des vollen Wirkmaximums des Cre-LoxP-Systems wurde bereits zuvor beschrieben (Postic et Magnuson, 2000). Postic et Magnuson vermuteten, die Zeitspanne bis zur vollständigen Entfaltung der Wirkung des Cre-LoxP-Systems hänge davon ab, unter der Kontrolle welchen Promotors die Cre-Rekombinase exprimiert wird. Abhängig von der Häufigkeit mit welcher das Gen exprimiert wird, unter Kontrolle

dessen Promotor die Cre-Rekombinase steht, ändere sich die Zeitspanne bis die Konzentration an Cre-Rekombinase in der Zelle den Schwellenwert erreiche, bei dem eine zügige Exzision des geflochten Allels stattfände (Postic et Magnuson, 2000). Auch Castellanos Rivera et al., welche ebenfalls mit einer Cre-Rekombinase arbeiteten, die unter der Kontrolle des Ren-1d-Promotors exprimiert wurde, äußerten die Vermutung in ihrer Studie habe sich die Wirkung des Cre-LoxP-Systems erst mit einiger Verzögerung voll entfaltet (Castellanos Rivera et al., 2011).

Castellanos Rivera et al. untersuchten Mäuse, bei welchen mit Hilfe des Cre-LoxP-Systems das Gen für das Protein RBP-J selektiv in reninexprimierenden Zellen ausgeschaltet worden war. Somit entfernten sie einen zentralen Baustein der Notch-Signalkaskade in diesen Zellen. Interessanterweise waren ihre Beobachtungen hinsichtlich der Auswirkung dieser genetischen Manipulation im Hinblick auf Abundanz, Morphologie und Lokalisation der reninbildenden Zellen den in dieser Arbeit an $Vhl^{-/-REN}$ -Tieren gemachten Beobachtungen sehr ähnlich.

Auch Castellanos Rivera et al. fanden eine deutliche Reduktion der Anzahl reninpositiver juxtaglomerulärer Apparate und insgesamt eine deutlich verminderte Abundanz reninexprimierender Zellen. Eine Stimulation des RAAS zeigte, dass die betreffenden Mäuse deutlich eingeschränkt waren in ihrer Fähigkeit die renale Renin-mRNA-Konzentration sowie die Plasmanreninkonzentration reaktiv zu steigern. Besonders fiel auf, dass die reninpositiven Zellen sehr zart ausgebildet waren, eine verringerte Anzahl an Granula aufwiesen und dass die immunhistochemische Färbung gegen Renin nur sehr schwach ausfiel. Die Autoren vermuteten, in den betreffenden Tieren sei entweder die Reninexpression aufgrund einer fehlenden Interaktion von RBP-J mit dem Reninpromotor beeinträchtigt worden oder aber die genetische Manipulation habe den Phänotyp der reninexprimierenden Zellen hin zu einem anderen Zelltyp verändert und in Folge dessen sei die Reninexpression herabreguliert worden (Castellanos Rivera et al., 2011).

Wie die Ähnlichkeit der Ergebnisse von Castellanos Rivera et al. mit denen dieser Arbeit erklärt werden können und ob zwischen den beiden Ergebnissen ein Zusammenhang besteht, ist derzeit noch unklar. Wie bereits erwähnt, bestehen zwischen dem HIF-System und der Notch-Signalkaskade gewisse Schnittstellen (Gustafsson et al., 2005; Chen et al., 2010; Pistollato et al., 2010; Greer et al., 2012). Allerdings wurde dies bisher eher im Zusammenhang mit HIF1 α beobachtet. Zudem wurde bisher stets beschrieben, das HIF-System beeinflusse die Expression Notch-abhängiger Gene in positiver Weise, wohingegen in Castellanos Riveras Versuch die Notch-Signalkaskade unterbrochen wurde. In beiden Studien wurden jedoch Signalsysteme manipuliert, welche auch an der Regulierung zellulärer Differenzierungszustände beteiligt sind. Somit erscheint die Theorie, in den reninzellspezifisch Vhl-defizienten Mäusen habe der Vhl-Genverlust zu einer Änderung des zellulären Differenzierungsstatus geführt, auch in diesem Zusammenhang plausibel.

4.4. Lokalisation reninexprimierender Zellen in der reninzellspezifisch Vhl-defizienten Maus

Ein verzögertes Einsetzen der Effektivität des Cre-LoxP-Systems liefert auch eine mögliche Erklärung für die ungewöhnliche Lokalisation reninexprimierender Zellen in den Vhl^{-/-REN}-Tieren – ganz unabhängig davon, welcher Zusammenhang zwischen Vhl-Genverlust und Verminderung der Reninexpression besteht.

In den genetisch manipulierten reninexprimierenden Zellen wird das Gen für Cre-Rekombinase mit der gleichen Häufigkeit abgelesen wie das Reningen. Je länger und häufiger das Reningen in den Zellen exprimiert wird, desto höher wird die Konzentration an Cre-Rekombinase und somit die Wahrscheinlichkeit, dass das gefloxtes Vhl-Gen homozygot aus dem Genom exzidiert wird. Es erscheint daher logisch, dass sich ein Verlust des Vhl-Gens als Erstes dort bemerkbar macht, wo Renin unter Normalbedingungen typischerweise exprimiert wird, nämlich in den juxtaglomerulär positionierten Zellen. In diesem Zusammenhang erscheint es schlüssig, dass in den

Knockout-Tieren jeweils ca. 50-60% der Glomeruli kein Renin am vaskulären Pol aufweisen. Es scheint, als habe in den juxtaglomerulären Zellen dieser Glomeruli ein Vhl-Genverlust stattgefunden, durch welchen die Reninexpression negativ beeinflusst wurde. Im Einklang mit dieser Theorie bleibt beim Knockout-Tier nach Stimulation des RAAS ein deutlich höherer Prozentsatz der vaskulären Pole frei von reninmarkierenden Signalen, als unter basalen Bedingungen.

Zusätzlich fallen beim stimulierten Tier Bereiche einer punktuellen Rekrutierung reninexprimierender Zellen bis hin auf die Ebene des interlobulären Hauptastes auf. Unter der Annahme, dass der Vhl-Genverlust mit einem Erliegen der Reninexpression einhergeht, könnte dies Abbild eines lokal fortschreitenden Vhl-Genverlustes sein. So ist denkbar, dass es im Zuge der retrograden Rekrutierung reninexprimierender Zellen und der somit erhöhten Aktivität der jeweiligen Reninpromotoren zu einem progressiven retrograden Vhl-Genverlust entlang des Gefäßbaums kommt und dass der damit einhergehende Verlust der Reninexpression in diesen Zellen eine Kompensation durch Neurekrutierung von immer weiter stromaufwärts gelegenen Zellen erfordert. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass in einigen Zellen der Gefäßwand der Vhl-Genverlust bereits während der Embryonalentwicklung eingetreten ist. Diese Zellen könnten später vermutlich nicht mehr zur Reninexpression rekrutiert werden. Dies könnte auch zum ungewöhnlichen Rekrutierungsmuster in der reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Maus beitragen.

4.5. Gefäßbaumentwicklung in der reninzellspezifisch Vhl-defizienten Maus

Der Gefäßbaumentwicklung in den reninzellspezifischen Vhl-Knockout-Mäusen wurde in dieser Arbeit aus verschiedenen Gründen eine besondere Aufmerksamkeit zugeteilt.

Zum einen ist schon seit Längerem bekannt, dass verschiedene Faktoren, die an der Regulierung der komplexen Abläufe von Vaskulogenese (de novo Bildung von Gefäßstrukturen) und Angiogenese (Aussprossung neuer Gefäße aus bereits

vorhandenen Gefäßen) beteiligt sind, sowie zum Teil auch deren Rezeptoren hypoxieinduzierbar sind. Ein klassischer Vertreter, für den schon sehr früh eine hypoxievermittelte Induzierbarkeit festgestellt wurde, ist hier VEGF (Shweiki et al., 1992; Minchenko et al., 1994; Levy et al., 1995; Liu et al., 1995).

Ob VEGF speziell unter der Kontrolle von HIF1 α oder HIF2 α steht oder ob beide Faktoren an dessen Regulierung beteiligt sind, ist noch unklar. Kurz nach der Entdeckung der HIF-Induzierbarkeit des VEGF-Gens (Forsythe et al., 1996) wurde hier eine besondere Rolle für HIF2 α postuliert (Ema et al., 1997; Wiesener et al., 1998; Takeda et al., 2004). Neuere Publikationen hingegen sehen dies eher im Zuständigkeitsbereich von HIF1 α (Sowter et al., 2003; Hänze et al., 2003; Warnecke et al., 2004). Vermutet wurde auch, dass beide Faktoren gleichermaßen an der Regulierung beteiligt sind (Freeburg et al., 2003) bzw. dass die Zuständigkeit der jeweiligen Faktoren zellabhängig ist (Wiesener et al., 1998). Speziell für eine Vhl-defiziente renale Karzinom-Zelllinie wurde eine Abhängigkeit VEGFs von HIF2 α postuliert (Sowter et al., 2003).

Auch für die beiden VEGF-Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 wurde eine Hypoxieinduzierbarkeit beschrieben (Gerber et al., 1997; Kappel et al., 1999). Dies wird wohl in beiden Fällen über HIF2 α vermittelt (Kappel et al., 1999; Elvert et al., 2003; Takeda et al., 2004), wobei im Falle von Flk-1 zusätzlich der Transkriptionsfaktor Ets-1 benötigt zu werden scheint (Elvert et al., 2003).

Aber auch andere für die Gefäßentwicklung wichtige Signalsysteme, wie beispielsweise das der Angiopoietine und seiner Tie-Rezeptoren scheinen zumindest teilweise HIF-vermittelt kontrolliert zu werden. Für den Angiopoietinrezeptor Tie-2 ist eine Regulierung durch HIF2 α bekannt (Tian et al., 1997) und auch für Angiopoietin 2 wurde eine hypoxievermittelte Induzierbarkeit gezeigt (Mandriota et al., 1998; Yuan et al., 2000).

Die experimentell nachgewiesene HIF-vermittelte Regulierung wichtiger angiogener Faktoren sowie das renale Auftreten von HIF-Isoformen parallel zur Nierenentwicklung

lassen einen Zusammenhang zwischen dem HIF-System und der renalen Gefäßentwicklung vermuten (Freeburg et Abrahamson, 2003; Bernhardt et al., 2006).

Jedoch lässt nicht nur die Manipulation im Bereich des HIF-Systems der $Vhl^{-/-REN}$ -Tiere eine genauere Betrachtung der Architektur des renalen Gefäßbaums interessant erscheinen. Ebenso wird seit längerer Zeit eine Rolle reninexprimierender Zellen für die korrekte Entwicklung des renalen Gefäßbaumes postuliert.

So beschrieben Reddi et al., dass in Ratten die Verteilung der reninexprimierenden Zellen räumlich und zeitlich mit der Entwicklung des renalen Gefäßbaumes assoziiert sei. Insbesondere schrieben sie den reninexprimierenden Zellen eine regulierende Rolle für die Ausbildung von Verzweigungen des renalen Gefäßbaumes zu. Sie vermuteten, die Entwicklung des vaskulären Baumes werde entweder durch Renin selbst oder durch die daran gekoppelte Bildung von Angiotensin II kontrolliert (Reddi et al., 1998).

Ebenso wurde beobachtet, dass medikamentöse bzw. genetische Manipulationen, die Auswirkungen auf die Anzahl reninexprimierender Zellen während der Nierenentwicklung haben, mit Veränderungen in der renalen Gefäßarchitektur einhergingen; das gilt sowohl für eine Erhöhung der Anzahl reninexprimierender Zellen (Tufro-McReddie et al., 1995; Hilgers et al., 1997), als auch für deren Verminderung (Neubauer et al., 2009). Dies lässt eine Bedeutung reninexprimierender Zellen für eine korrekte Ausbildung des renalen Gefäßbaumes wahrscheinlich erscheinen.

Neben einer Rolle für Renin oder Angiotensin II in der renalen Gefäßentwicklung wurde ebenso vermutet, reninbildende Zellen könnten Faktoren sezernieren, die einen Einfluss auf die Entwicklung der vaskulären Glattmuskelzellen nähmen (Hilgers et al., 1997; Pentz et al., 2004).

Vor Kurzem schließlich konnten Brunskill et al. durch Genexpressionsprofile renaler reninexprimierender Zellen verschiedener Stadien der Nierenentwicklung zeigen, dass die reninproduzierenden Zellen zeitlich parallel zur renalen Gefäßbaumentwicklung angiogene Faktoren - unter anderem Angiopoietin 2 - exprimieren (Brunskill et al., 2011).

Neben einer vermutlichen Bedeutung des HIF-Systems für die korrekte Ausbildung des renalen Gefäßbaums lassen somit auch die Auffälligkeiten im Bereich der renalen Reninexpression der $Vhl^{-/-REN}$ -Tiere eine nähere Betrachtung der renalen Gefäßarchitektur interessant erscheinen.

Im Vergleich von Architektur sowie Morphologie des renalen Gefäßsystems von reninzellspezifischer Vhl -Knockout-Maus und Kontrollmaus fiel lediglich auf, dass der Durchmesser der afferenten Arteriolen beim Knockout-Tier unter Normalbedingungen insgesamt etwas größer war, als beim Kontrolltier. Bei den Messungen wurde der äußere Durchmesser der afferenten Arteriolen ermittelt. Im Verlauf der afferenten Arteriolen ergaben die Messungen signifikante Unterschiede zwischen Knockout- und Kontrolltier, am vaskulären Pol verfehlte der Unterschied mit einem p-Wert von 0,0533 das Signifikanzniveau knapp. Interessanterweise ergaben ebenfalls in unserem Labor durchgeführte Messungen zum inneren Durchmesser der afferenten Arteriolen einen hochsignifikanten Unterschied zwischen reninzellspezifischer Knockout-Maus und Kontrolle im Bereich des vaskulären Pols (Kurt et al., 2013). In diesem Bereich zeigen die afferenten Arteriolen der Knockout-Tiere eine bereits unter dem Mikroskop auffällige Erweiterung ihrer afferenten Arteriolen. Dass sich bei den Messungen des äußeren Durchmessers in dieser Arbeit zwar beim Knockout-Tier ein Trend hinsichtlich einer Erweiterung der afferenten Arteriolen im Bereich des vaskulären Pols zeigte ($15,98 \pm 0,53 \mu m$ $Vhl^{fl/fl}$ bzw. $17,51 \pm 0,53 \mu m$ $Vhl^{-/-REN}$), der Unterschied jedoch bei einem p-Wert von 0,0533 knapp das Signifikanzniveau verfehlte, mag daran liegen, dass die juxtaglomerulären Zellen im Knockout sehr fein und zart ausgeprägt sind. Hierdurch ergibt sich beim Knockout-Tier eine deutliche Verminderung der Wanddicke im Bereich des vaskulären Pols, sodass hier ein vergrößerter innerer Gefäßdurchmesser einer verminderten Gefäßwanddicke gegenübersteht. Bei Messungen zum äußeren Durchmesser im Bereich des vaskulären Pols scheinen sich diese beiden Gefäßveränderungen zu kompensieren, sodass der Unterschied zum Kontrolltier nur gering ausfällt.

Die Ursache für die Erweiterung des Durchmessers der afferenten Arteriolen im Knockout-Tier müssen im Rahmen dieser Arbeit spekulativ bleiben. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass die in dieser Arbeit beobachtete Erweiterung des Durchmessers im Verlauf der afferenten Arteriolen lediglich auf einem zufälligen Größenunterschied zwischen Knockout- und Kontrolltier beruht, da jeweils nur ein Tier untersucht wurde. Andererseits wäre diese Beobachtung vereinbar mit der Theorie, das Vhl-Protein sei wichtig für den Erhalt des Reninzellphänotyps. Neben der Reninexpression sind auch myokontraktile Eigenschaften charakteristisch für die renalen reninexprimierenden Zellen (Brunskill et al., 2011). Sollte ein Verlust des Vhl-Proteins in diesem Mausmodell tatsächlich zu einer Umdifferenzierung der betroffenen Zellen führen, so könnte ein eventuell damit ebenfalls verbundener Verlust der myokontraktilen Eigenschaften eine Erweiterung des Durchmessers derjenigen Gefäße zur Folge haben, in deren Wand sich die betroffenen Zellen befinden.

Unter Stimulationsbedingungen konnten im Verlauf der afferenten Arteriolen keine signifikanten Unterschiede zwischen reninzellspezifischer Knockout-Maus und Kontrolltier festgestellt werden. Jedoch gestaltet sich ein Vergleich unter diesen Bedingungen schwierig, da beim Kontrolltier im Bereich der afferenten Arteriolen sehr viele reninbildende Zellen rekrutiert wurden. Die in diesen Zellen zahlreich vorhandenen reningefüllten Vesikel könnten einen Einfluss auf den äußeren Durchmesser der afferenten Arteriolen haben. Da sich im Knockout-Tier nur wenige rekrutierte Zellen im Bereich der afferenten Arteriolen fanden, erscheint ein Vergleich des Durchmessers der afferenten Arteriolen von Knockout und Kontrolle unter diesen Bedingungen schwierig.

Abgesehen von einer leichten Erweiterung des Durchmessers der afferenten Arteriolen unter Normalbedingungen wurden in dieser Arbeit keine wesentlichen Auffälligkeiten hinsichtlich der renalen Gefäßbaumarchitektur der $Vhl^{-/-REN}$ -Tiere festgestellt. Somit scheint die genetische Manipulation in diesem Mausmodell keine schwerwiegenden Konsequenzen hinsichtlich der Entwicklung des renalen Gefäßbaumes zur Folge gehabt zu haben.

Geht man davon aus, dass das Cre-LoxP-System wie bereits erläutert erst mit Verzögerung seine Wirkung entfaltet hat, so scheint die Reninexpression zum Zeitpunkt der Entwicklung des renalen Gefäßbaumes noch ausreichend für dessen korrekte Ausbildung gewesen zu sein. Einhergehend mit der verspäteten Aktivierung des Cre-LoxP-Systems könnten auch die Veränderungen hinsichtlich der renalen HIF-Konzentrationen ohne merkliche Auswirkungen geblieben sein, zumal während der Entwicklung auch in Wildtypnieren eine starke HIF-Expression nachgewiesen wurde (Freeburg et Abrahamson, 2003). Jedoch spielt speziell das Angiopietin System auch bei der nachträglichen Aussprossung von Gefäßen eine Rolle (Woolf et Yuan, 2001) und in den Nieren der adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Kontrolltiere konnte kein HIF mehr nachgewiesen werden (Kurt et al., 2013). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass es bei den adulten $Vhl^{-/-REN}$ -Tieren aufgrund einer im Adultstadium persistierenden renalen HIF-Expression und damit eventuell einhergehender Produktion angiogener Faktoren mit der Zeit zu Veränderungen der renalen Gefäßarchitektur kommen könnte.

Inwiefern tatsächlich ein direkter Zusammenhang zwischen der Lokalisation reninexprimierender Zellen und dem lokalen Auftreten von Gefäßverzweigungen während der Entwicklung des renalen Gefäßbaumes besteht, ist umstritten (Reddi et al., 1998; Sauter & Machura et al., 2008). In diesem Kontext ist die in dieser Arbeit beobachtete verstärkte Rekrutierung reninexprimierender Zellen im Bereich von Gefäßabgängen und -gabelungen im $Vhl^{-/-REN}$ -Tier nach Stimulation des RAAS ein interessanter Gesichtspunkt. Ob hier durch eine verstärkte Rekrutierung bis weit proximal in den Gefäßbaum hinein tatsächlich das embryonale Muster der Verteilung reninexprimierender Zellen rekapituliert wird (Gomez et al., 1988b; Sequeira Lopez et al., 2004) – dies wäre im Sinne einer Rolle reninexprimierender Zellen im Rahmen der Ausbildung renaler Gefäßverzweigungen positiv zu deuten - oder ob hier andere Faktoren mit hineinspielen, bleibt im Rahmen dieser Arbeit spekulativ.

4.6. Zusammenfassung und Ausblick

Zentrale Frage dieser Arbeit war, ob das bis heute in seinem Zustandekommen noch nicht geklärte Verteilungsmuster reninexprimierender Zellen im renalen Gefäßbaum während der Entwicklung über sauerstoffmangelvermittelnde Signale, beispielsweise im Sinne einer Minderdurchblutung, gesteuert wird und inwiefern diese bei Rekrutierungsvorgängen im adulten Tier eine Rolle spielen. Hierzu wurden Mäuse untersucht, in welchen das Vhl-Gen mittels des Cre-LoxP-Systems selektiv nur in reninexprimierenden Zellen ausgeschaltet worden war und somit der HIF-Transkriptionsfaktor stabilisiert. Wider Erwarten führte das konstante Vorhandensein des sauerstoffmangelsignalisierenden Transkriptionsfaktors HIF nicht zu einer verstärkten Reninexpression in den Nieren der untersuchten Tiere. Im Gegenteil, die Abundanz reninexprimierender Zellen war im Vergleich zu den Kontrolltieren verringert und die Fähigkeit zur Reninzellrekrutierung in Reaktion auf eine Stimulation des RAAS eingeschränkt. Die Lokalisation und Verteilung reninexprimierender Zellen in den Knockout-Tieren war insofern ungewöhnlich, als dass die für die Reninexpression typische juxtaglomeruläre Position häufig frei von reninpositiven Zellen blieb. Neben einer ungewöhnlichen Lokalisation wiesen die reninexprimierenden Zellen aber auch eine auffällige Morphologie auf. Sie erschienen schmal und die Reninfärbung wies insgesamt eine geringere Intensität als bei den Kontrolltieren auf.

Eine mögliche Erklärung für die verminderte Reninexpression sowie die veränderte Morphologie reninexprimierender Zellen in den Knockout-Tieren wäre, dass der Vhl-Genverlust eine Änderung des Differenzierungsstatus der betroffenen Zellen zur Folge hat. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in den Knockout-Tieren parallel zu einer verminderten renalen Reninexpression sowie Reninplasmakonzentration eine erhöhte EPO-Expression sowie EPO-Plasmakonzentration festgestellt wurde (Kurt et al., 2013). Die EPO-mRNA Abundanz in den Nieren dieser Tiere stieg auf eine Stimulation des RAAS hin an. Dies könnte im Sinne einer Koppelung der beiden Signalwege gedeutet werden. Die Theorie einer Bedeutung des Vhl-Gens für den Erhalt des Reninzellphänotyps bedarf jedoch weiterer Untermauerung, beispielsweise durch die

Erstellung von Expressionsprofilen. So könnte überprüft werden, inwiefern in den Vhl-defizienten Zellen weiterhin reninzelltypische Marker exprimiert werden.

Weitere interessante Fragen in diesem Kontext wären:

Besteht ein entwicklungsgeschichtlicher Zusammenhang zwischen Renin- und EPO-exprimierenden Zellen? Wie agiert HIF in reninexprimierenden Zellen? Spielen HIF-unabhängige VHLp-vermittelte Effekte eine Rolle in diesem Mausmodell?

Um einer Antwort auf die letzten beiden Fragen näher zu kommen, werden derzeit in unserem Labor Studien an reninzellspezifischen Vhl- und HIF2 α -Doppelknockout-Mäusen durchgeführt.

5.Zusammenfassung

Schon seit längerer Zeit beschäftigt die Wissenschaft das Phänomen des geregelten An- und Abschaltens der Reninexpression während der Entwicklung des renalen Gefäßbaums, ebenso wie das Phänomen der Rekrutierung reninbildender Zellen nach Stimulation des RAAS im Adultstadium. Noch immer ist nicht klar, welche Faktoren Einsetzen und Beendigung der Reninexpression in den Zellen des renalen Gefäßbaums triggern. In den letzten Jahren entwickelte sich in der Wissenschaft die Konzeption, dass die reversible Akquisition des Reninzellphänotyps durch eine Änderung des Differenzierungsstatus entwicklungsgeschichtlich vorprogrammierter Zellen bedingt sei. Hypoxie kann sowohl während der Entwicklung als auch im Adultstadium zelluläre Differenzierungszustände beeinflussen. Es ist denkbar, dass reninexprimierende Zellen während der Entwicklung des renalen Gefäßbaums oder später im Adultzustand, beispielsweise aufgrund einer durch Hypotension bedingten Minderperfusion, hypoxische Zustände erdulden müssen und dass das Reninexpressionsmuster im renalen Gefäßbaum dadurch beeinflusst wird. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Bedeutung von Hypoxie für das Erlangen des Reninzellphänotyps in Zellen des renalen Gefäßbaums untersucht.

Hypoxische Zustände führen intrazellulär zur Stabilisierung von HIF α (hypoxia-inducible-factor- α) mit nachfolgender Bildung eines Transkriptionskomplexes und Expression spezifischer Gene. Unter normoxischen Verhältnissen wird HIF α im Proteasom abgebaut, woran das von-Hippel-Lindau Protein (VHLp) entscheidend beteiligt ist. Mittels des Cre-LoxP-Systems ist es möglich, das Gen für VHLp spezifisch nur in solchen Zellen zu deletieren, in welchen Renin exprimiert wird. In diesen Zellen wird HIF α dann dauerhaft stabilisiert und somit ein anhaltender Sauerstoffmangel simuliert.

Um herauszufinden, ob Hypoxie für das Erlangen des Reninzellphänotyps in den renovaskulären Zellen eine Rolle spielt, wurden in dieser Arbeit die Nieren solcher reninzellspezifisch Vhl-defizienter Mäuse histologisch untersucht. Um das renale Reninexpressionsmuster in seiner räumlichen Ausbreitung detailliert beurteilen zu können, wurden zudem dreidimensionale Rekonstruktionen von repräsentativen Gefäßbaumausschnitten angefertigt. Anhand dieser Rekonstruktionen wurde auch die

Morphologie der jeweiligen Gefäßbäume umfassend analysiert, um Einflüsse einer vermehrten HIF- sowie einer veränderten Reninexpression auf die renale Gefäßentwicklung zu prüfen. Es wurde jeweils eine adulte Knockout-Maus unter Normalbedingungen sowie nach Stimulation des RAAS und diesen entsprechende Kontrolltiere untersucht.

In reninzellspezifisch Vhl-defizienten Mäusen war die Anzahl reninpositiver Zellen im renalen Gefäßbaum deutlich reduziert. Zudem waren die Zellen morphologisch durch ihre Feinheit und histologisch durch ihre schwächere immunhistochemische Anfärbbarkeit auffällig. Die reninpositiven Zellen dieser Tiere waren häufig nicht in der typischen juxtaglomerulären Position anzufinden, sondern weiter stromaufwärts im Gefäßbaum. In all diesen Punkten war der Unterschied zwischen Knockout und Kontrolle nach Stimulation des RAAS noch gravierender. Eine gewisse Fähigkeit zur Rekrutierung in Reaktion auf eine Stimulation des RAAS war dem Knockout-Tier erhalten geblieben. Jedoch erfolgte die Rekrutierung zum Teil ungewöhnlich weit stromaufwärts in den Gefäßbaum hinein, wohingegen knapp 50% der afferenten Arteriolen gänzlich frei von reninpositiven Zellen blieben. Auffällig war die häufige Lokalisation reninpositiver Zellen im Bereich von Gefäßabgängen und Gefäßgabelungen. Es konnten keine wesentlichen Auffälligkeiten hinsichtlich der Gefäßarchitektur der Knockout-Tiere festgestellt werden.

Die Stabilisierung von HIF α bzw. der Verlust des Vhl-Gens beeinflussten die Reninexpression im renalen Gefäßbaum wider Erwarten negativ. An den klassischen Orten einer starken Reninexpression, den juxtaglomerulären Bereichen, kam die Reninexpression zum größten Teil vollständig zum Erliegen. Viele der reninexprimierenden Zellen waren nur schwach anfärbbar und wiesen eine ungewöhnliche Morphologie auf. Es scheint, als ob das Cre-LoxP-System in diesem Mausmodell eine gewisse Reninexpressionsaktivität der betroffenen Zellen benötigt, bis es effektiv wird. Der konsekutive Verlust des Vhl-Gens scheint jedoch mit einem fortschreitenden Erliegen der Reninexpression einherzugehen. Neben dem Erliegen der Reninexpression und morphologischen Veränderungen der Zellen geben interessante Daten von Frau Dr. Birgül Kurt aus unserem Labor hinsichtlich einer EPO-Expression in

den Vhl-defizienten Zellen Anlass zur Vermutung, dass die Exzision des Vhl-Gens mit dem Verlust des Reninzellphänotyps und einer Umdifferenzierung der betroffenen Zellen einhergeht.

Derzeit bleibt noch unklar, ob die Veränderungen in den betroffenen Zellen direkt durch die Defizienz von VHLp oder indirekt durch die Akkumulation von HIF α bedingt sind.

6.Abstract

For some time already scientists are investigating the phenomenon of the well regulated switching-on and off of renin-expression during renal vascular tree development, as well as the phenomenon of the recruitment of renin-expressing cells after a stimulation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) in the adult. Until now it remains unclear which factors are triggering the initiation and interruption of renin-expression in selected cells of the renal vascular tree. In the past years the conception has developed that the reversible acquisition of the renin phenotype is determined by a change of the differentiation status of developmentally preassigned cells. Hypoxia can have an influence on the differentiation status of cells during development as well as during adulthood. It is conceivable that during the development of the renal vascular tree or later during adulthood renin-expressing cells are suffering hypoxic conditions – for instance in the context of reduced perfusion due to hypotension – and that the pattern of renin expression in the renal vascular tree is influenced by these conditions. Therefore it was the aim of this dissertation to test the relevance of hypoxia for the acquisition of the renin phenotype by cells of the renal vascular tree.

Hypoxic conditions lead to the intracellular stabilization of HIF α (hypoxia-inducible-factor- α) and consequently to the generation of a transcription complex and the expression of specific genes. Under normoxic conditions HIF α is rapidly degraded in the proteasome with the von-Hippel-Lindau protein (VHLp) being crucially involved in this process. Employing the Cre-LoxP-System it is feasible to specifically delete the gene for VHLp only in those cells expressing renin. Consequently in these cells HIF α is stabilized permanently thus simulating sustained oxygen deficiency.

To determine whether hypoxia is relevant for the acquisition of the renin phenotype in the renovascular cells, in this dissertation kidneys of such mice being specifically deficient of the gene for VHLp in renin expressing cells have been examined histologically. To be able to evaluate the renal pattern of renin expression in its spacial dissemination, three-dimensional reconstructions of representative areas of the renal vascular tree have been generated additionally. On the basis of these reconstructions the morphology of the respective vascular trees has equally been analyzed extensively,

to consider a possible influence of an increased HIF-expression and an altered renin expression on renal vascular development. In this dissertation two adult knockout-mice have been examined - one of them grown-up under normal conditions the other one having undergone RAAS stimulation - and respective control animals.

In mice with a renin-cell specific deletion of the gene for VHLp the number of renin-positive cells in the renal vascular tree was considerably reduced. In addition morphologically the fineness of these cells and histologically their weak susceptibility for renin-staining were striking. Frequently the renin-positive cells of the knockout-animals could not be detected in their typical juxtaglomerular position, but more upstream in the renal vascular tree. Generally the differences between knockout- and control-animal became even more apparent after RAAS stimulation. A certain ability to recruit renin-expressing cells in reaction to a RAAS stimulation had been conserved in the knockout-animal. However recruited cells could be localized unusually far upstream within the renal vascular tree, whereas in nearly 50% of the afferent arterioles no renin-positive cells were found at all. The frequent localization of renin-expressing cells within the areas of vascular branching points and in those parts of the afferent arterioles that were closely located to vascular bifurcations was striking. No fundamental abnormalities concerning the architecture of the renal vascular tree could be detected in the knockout-animals.

Contrary to expectations the stabilization of HIF α and the deficiency of the gene for VHLp respectively had a negative influence on renin-expression in the cells of the renal vascular tree. In the classical locations of abundant renin expression – the juxtaglomerular areas – renin expression had ceased completely for the most part. Many of the renin-expressing cells stained only very weakly for renin and exhibited an unusual morphology. In this mouse model the Cre-LoxP-System seems to require a certain level of activity of renin expression in the respective cells to come into operation. The consecutive loss of the gene for VHLp however seems to come along with a progressive cessation of renin expression. Besides the cessation of renin expression and morphological changes in the respective cells interesting data from Ms. Dr. Birgül Kurt in

our laboratory regarding an EPO-expression in these VHLp-deficient cells make it tempting to speculate that the loss of the gene for VHLp comes along with the loss of the renin phenotype and with a change in the differentiation status of the respective cells.

At present it remains ambiguous, whether the changes in the respective cells are caused directly by the deficiency of VHLp or indirectly by the accumulation of HIF α .

7.Literaturverzeichnis

Adryan B, Decker HJ, Papas TS, Hsu T. Tracheal development and the von Hippel-Lindau tumor suppressor homolog in Drosophila. *Oncogene*. 2000 Jun 1;19(24):2803-11.

Aprelikova O, Wood M, Tackett S, Chandramouli GV, Barrett JC. Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res*. 2006 Jun 1;66(11):5641-7.

Atchison DK, Beierwaltes WH. The influence of extracellular and intracellular calcium on the secretion of renin. *Pflugers Arch*. 2013 Jan;465(1):59-69.

Bader M, Ganten D. Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mol Med (Berl)*. 2000;78(3):130-9.

Bader M, Peters J, Baltatu O, Müller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med (Berl)*. 2001 Apr;79(2-3):76-102.

Bader HL, Hsu T. Systemic VHL gene functions and the VHL disease. *FEBS Lett*. 2012 Jun 4;586(11):1562-9.

Barajas L. The ultrastructure of the juxtaglomerular apparatus as disclosed by three-dimensional reconstructions from serial sections. The anatomical relationship between the tubular and vascular components. *J Ultrastruct Res*. 1970 Oct;33(1):116-47.

Barajas L. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol*. 1979 Nov;237(5):F333-43.

Barrett CJ, Ramchandra R, Guild SJ, Lala A, Budgett DM, Malpas SC. What sets the long-term level of renal sympathetic nerve activity: a role for angiotensin II and baroreflexes? *Circ Res*. 2003 Jun 27;92(12):1330-6.

Beierwaltes WH. The role of calcium in the regulation of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Jan;298(1):F1-F11.

Bernhardt WM, Schmitt R, Rosenberger C, Münchenhagen PM, Gröne HJ, Frei U, Warnecke C, Bachmann S, Wiesener MS, Willam C, Eckardt KU. Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney Int*. 2006 Jan;69(1):114-22.

Bishop T, Lau KW, Epstein AC, Kim SK, Jiang M, O'Rourke D, Pugh CW, Gleadow JM, Taylor MS, Hodgkin J, Ratcliffe PJ. Genetic analysis of pathways regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol*. 2004 Oct;2(10):e289.

Blankenship C, Naglich JG, Whaley JM, Seizinger B, Kley N. Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity. *Oncogene*. 1999 Feb 25;18(8):1529-35.

Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001 Nov 9;294(5545):1337-40.

Brunskill EW, Sequeira-Lopez ML, Pentz ES, Lin E, Yu J, Aronow BJ, Potter SS, Gomez RA. Genes that confer the identity of the renin cell. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Dec;22(12):2213-25.

Cantin M, Araujo-Nascimento MD, Benchimol S, Desormeaux Y. Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, and arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. An ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study. *Am J Pathol*. 1977 Jun;87(3):581-602.

Castellanos Rivera RM, Monteagudo MC, Pentz ES, Glenn ST, Gross KW, Carretero O, Sequeira-Lopez ML, Gomez RA. Transcriptional regulator RBP-J regulates the number and plasticity of renin cells. *Physiol Genomics*. 2011 Sep 8;43(17):1021-8.

Castrop H, Oppermann M, Weiss Y, Huang Y, Mizel D, Lu H, Germain S, Schweda F, Theilig F, Bachmann S, Briggs J, Kurtz A, Schnermann J. Reporter gene recombination in juxtaglomerular granular and collecting duct cells by human renin promoter-Cre recombinase transgene. *Physiol Genomics*. 2006 Apr 13;25(2):277-85.

Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev*. 2010 Apr;90(2):607-73.

Chavez JC, Baranova O, Lin J, Pichiule P. The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J Neurosci*. 2006 Sep 13;26(37):9471-81.

Chen L, Kim SM, Oppermann M, Faulhaber-Walter R, Huang Y, Mizel D, Chen M, Lopez ML, Weinstein LS, Gomez RA, Briggs JP, Schnermann J. Regulation of renin in mice with Cre recombinase-mediated deletion of G protein Gsalpha in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jan;292(1):F27-37.

Chen J, Imanaka N, Chen J, Griffin JD. Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion. *Br J Cancer*. 2010 Jan 19;102(2):351-60.

Collins ET. Two cases, brother and sister, with peculiar vascular new growth probably primarily retinal, affecting both eyes. *Trans Ophthalmol Soc UK* 14:141–9, 1894

Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 2006 Mar 1;20(5):557-70.

Cowden Dahl KD, Fryer BH, Mack FA, Compennolle V, Maltepe E, Adelman DM, Carmeliet P, Simon MC. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha regulate trophoblast differentiation. *Mol Cell Biol.* 2005 Dec;25(23):10479-91.

Cushing H, Bailey P. Hemangiomas of Cerebellum and Retina (Lindau's Disease): With the Report of a Case. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1928;26:182-202.

Davidowitz EJ, Schoenfeld AR, Burk RD. VHL induces renal cell differentiation and growth arrest through integration of cell-cell and cell-extracellular matrix signaling. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(3):865-74.

Davis JO, Freeman RH. Mechanisms regulating renin release. *Physiol Rev.* 1976 Jan;56(1):1-56.

Ehmke H, Persson P, Kirchheim H. A physiological role for pressure-dependent renin release in long-term blood pressure control. *Pflugers Arch.* 1987 Nov;410(4-5):450-6.

Ehmke H, Persson P, Fischer S, Hackenthal E, Kirchheim H. Resetting of pressure-dependent renin release by intrarenal alpha 1-adrenoceptors in conscious dogs. *Pflugers Arch.* 1989 Jan;413(3):261-6.

Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T, Rauter M, Plate K, Sieweke M, Breier G, Flamme I. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem.* 2003 Feb 28;278(9):7520-30.

Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 29;94(9):4273-8.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001 Oct 5;107(1):43-54.

Esteban MA, Tran MG, Harten SK, Hill P, Castellanos MC, Chandra A, Raval R, O'brien TS, Maxwell PH. (*Esteban et al., 2006a*). Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res.* 2006 Apr 1;66(7):3567-75.

Esteban MA, Harten SK, Tran MG, Maxwell PH. (*Esteban et al., 2006b*). Formation of primary cilia in the renal epithelium is regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jul;17(7):1801-6

Farhi ER, Cant JR, Barger AC. Alteration of renal baroreceptor by salt intake in control of plasma renin activity in conscious dogs. *Am J Physiol.* 1983 Jul;245(1):F119-22.

Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Sep;9(9):1716-22.

Finke R, Gross R, Hackenthal E, Huber J, Kirchheim HR. Threshold pressure for the pressure-dependent renin release in the autoregulating kidney of conscious dogs. *Pflugers Arch.* 1983 Oct;399(2):102-10.

Fisher JW, Samuels AI, Langston JW. Effects of angiotensin and renal artery constriction on erythropoietin production. *J Pharmacol Exp Ther.* 1967 Sep;157(3):618-25.

Flamme I, Fröhlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev.* 1997 Apr;63(1):51-60.

Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, Houghton FD. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction.* 2010 Jan;139(1):85-97.

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996 Sep;16(9):4604-13.

Freeburg PB, Abrahamson DR. Hypoxia-inducible factors and kidney vascular development. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2723-30.

Freeburg PB, Robert B, St John PL, Abrahamson DR. Podocyte expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 during glomerular development. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Apr;14(4):927-38.

Friis UG, Madsen K, Stubbe J, Hansen PB, Svenningsen P, Bie P, Skøtt O, Jensen BL. Regulation of renin secretion by renal juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch.* 2013 Jan;465(1):25-37.

Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science.* 1997 Sep 12;277(5332):1669-72.

Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 1997 Sep 19;272(38):23659-67.

Giraud-Triboult K, Rochon-Beaucourt C, Nissan X, Champon B, Aubert S, Piétu G. Combined mRNA and microRNA profiling reveals that miR-148a and miR-20b control human mesenchymal stem cell phenotype via EPAS1. *Physiol Genomics.* 2011 Jan 1;43(2):77-86.

Glenn ST, Jones CA, Gross KW, Pan L. Control of renin [corrected] gene expression. *Pflugers Arch.* 2013 Jan;465(1):13-21.

Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet.* 1994 May;7(1):85-90.

Gnarra JR, Ward JM, Porter FD, Wagner JR, Devor DE, Grinberg A, Emmert-Buck MR, Westphal H, Klausner RD, Linehan WM. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Aug 19;94(17):9102-7.

Gomez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Everett AD, Johns DW, Wilfong N, Peach MJ, Carey RM. (*Gomez et al., 1988a*). Renin and angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *Am J Physiol.* 1988 Jun;254(6 Pt 2):F900-6.

Gomez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Wilfong N, Everett A, Carey RM, Peach MJ. (*Gomez et al., 1988b*). Renin and angiotensinogen gene expression in maturing rat kidney. *Am J Physiol.* 1988 Apr;254(4 Pt 2):F582-7.

Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, Elwood JP, Chevalier RL, Carey RM, Peach MJ. Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am J Physiol.* 1989 Nov;257(5 Pt 2):F850-8.

Gomez RA, Chevalier RL, Everett AD, Elwood JP, Peach MJ, Lynch KR, Carey RM. Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *Am J Physiol.* 1990 Oct;259(4 Pt 2):F660-5.

Gomez RA, Norwood VF. Developmental consequences of the renin-angiotensin system. *Am J Kidney Dis.* 1995 Sep;26(3):409-31.

Gomez RA, Pentz ES, Jin X, Cordailat M, Sequeira Lopez ML. CBP and p300 are essential for renin cell identity and morphological integrity of the kidney. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 May;296(5):H1255-62.

Gomez RA, Sequeira Lopez ML. Who and where is the renal baroreceptor?: the connexin hypothesis. *Kidney Int.* 2009 Mar;75(5):460-2.

Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J.* 2012 May 30;31(11):2448-60.

Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC. Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Feb 13;104(7):2301-6.

Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr.* 1998;7(3):205-13. (nur Abstract)

Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell.* 2005 Nov;9(5):617-28.

Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):1720-30.

Haase VH, Glickman JN, Socolovsky M, Jaenisch R. Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Feb 13;98(4):1583-8.

Haase VH. Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Aug;291(2):F271-81.

Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev.* 1990 Oct;70(4):1067-116.

Hänze J, Eul BG, Savai R, Krick S, Goyal P, Grimminger F, Seeger W, Rose F. RNA interference for HIF-1alpha inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Dec 19;312(3):571-7.

Hergovich A, Lisztwan J, Barry R, Ballschmieter P, Krek W. Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat Cell Biol.* 2003 Jan;5(1):64-70.

Hilgers KF, Reddi V, Krege JH, Smithies O, Gomez RA. Aberrant renal vascular morphology and renin expression in mutant mice lacking angiotensin-converting enzyme. *Hypertension.* 1997 Jan;29(1 Pt 2):216-21.

Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science.* 1991 May 17;252(5008):954-8.

Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem.* 1997 Mar 28;272(13):8581-93.

Holmer S, Rinne B, Eckardt KU, Le Hir M, Schricker K, Kaissling B, Riegger G, Kurtz A. Role of renal nerves for the expression of renin in adult rat kidney. *Am J Physiol.* 1994 May;266(5 Pt 2):F738-45.

Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol Biol Cell.* 2007 Nov;18(11):4528-42.

Huang T, Wan S, Xu Z, Zheng Y, Feng KY, Li HP, Kong X, Cai YD. Analysis and prediction of translation rate based on sequence and functional features of the mRNA. *PLoS One.* 2011 Jan 6;6(1):e16036.

Hughes MD, Kapllani E, Alexander AE, Burk RD, Schoenfeld AR. HIF-2alpha downregulation in the absence of functional VHL is not sufficient for renal cell differentiation. *Cancer Cell Int.* 2007 Jun 28;7:13.

Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG Jr, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Oct 1;93(20):10595-9.

Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG Jr. pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Sep 29;95(20):11661-6.

Imagawa J, Miyauchi T, Satoh S. Direct relationship between renal arterial pressure and plasma renin activity in conscious rats. *Jpn J Pharmacol.* 1984 Aug;35(4):481-4.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science.* 2001 Apr 20;292(5516):464-8.

Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, Minato N, Conaway RC, Conaway JW, Klausner RD, Pause A. Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 Oct 26;96(22):12436-41.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001 Apr 20;292(5516):468-72.

Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev.* 1998 Apr;73(1):117-23.

Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996 Jul 26;271(30):17771-8.

Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem.* 1997 Aug 1;272(31):19253-60.

Jögi A, Øra I, Nilsson H, Lindeheim A, Makino Y, Poellinger L, Axelson H, Pålman S. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 May 14;99(10):7021-6.

Jones CA, Sigmund CD, McGowan RA, Kane-Haas CM, Gross KW. Expression of murine renin genes during fetal development. *Mol Endocrinol.* 1990 Mar;4(3):375-83.

Kaelin WG. Von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathol.* 2007;2:145-73.

Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008 Nov;8(11):865-73.

Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J.* 1998 Nov 16;17(22):6573-86.

Kamura T, Koepp DM, Conrad MN, Skowrya D, Moreland RJ, Iliopoulos O, Lane WS, Kaelin WG Jr, Elledge SJ, Conaway RC, Harper JW, Conaway JW. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science.* 1999 Apr 23;284(5414):657-61.

Kapitsinou PP, Haase VH. The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ.* 2008 Apr;15(4):650-9.

Kappel A, Röncke V, Damert A, Flamme I, Risau W, Breier G. Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice. *Blood.* 1999 Jun 15;93(12):4284-92.

Kato H, Ishida J, Imagawa S, Saito T, Suzuki N, Matsuoka T, Sugaya T, et al. Enhanced erythropoiesis mediated by activation of the renin-angiotensin system via angiotensin II type 1a receptor. *FASEB J.* 2005 Dec;19(14):2023-5.

Kim HS, Maeda N, Oh GT, Fernandez LG, Gomez RA, Smithies O. Homeostasis in mice with genetically decreased angiotensinogen is primarily by an increased number of renin-producing cells. *J Biol Chem.* 1999 May 14;274(20):14210-7.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971 Apr;68(4):820-3.

Knudson AG Jr. Genetics of human cancer. *J Cell Physiol Suppl.* 1986;4:7-11.

Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci.* 2012 Sep;37(9):364-72.

Kon Y, Hashimoto Y, Kitagawa H, Kudo N. An immunohistochemical study on the embryonic development of renin-containing cells in the mouse and pig. *Anat Histol Embryol.* 1989 Mar;18(1):14-26.

Kon Y, Alcorn D, Murakami K, Sugimura M, Ryan GB. Immunohistochemical studies of renin-containing cells in the developing sheep kidney. *Anat Rec.* 1994 Jun;239(2):191-7.

Kon Y. Comparative study of renin-containing cells. Histological approaches. *J Vet Med Sci.* 1999 Oct;61(10):1075-86.

Kondo K, Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res.* 2001 Mar 10;264(1):117-25.

Krattinger N, Capponi A, Mazzolai L, Aubert JF, Caille D, Nicod P, Waeber G, Meda P, Haefliger JA. Connexin40 regulates renin production and blood pressure. *Kidney Int.* 2007 Oct;72(7):814-22.

Kurban G, Hudon V, Duplan E, Ohh M, Pause A. Characterization of a von Hippel Lindau pathway involved in extracellular matrix remodeling, cell invasion, and angiogenesis. *Cancer Res.* 2006 Feb 1;66(3):1313-9.

Kurt B, Paliege A, Willam C, Schwarzensteiner I, Schucht K, Neymeyer H, Sequeira-Lopez ML, Bachmann S, Gomez RA, Eckardt KU, Kurtz A. Deletion of von Hippel-Lindau protein converts renin-producing cells into erythropoietin-producing cells. *J Am Soc Nephrol.* 2013 Feb;24(3):433-44.

Kurtz A, Wagner C. Cellular control of renin secretion. *J Exp Biol.* 1999 Feb;202(Pt 3):219-25.

Kurtz A. Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:377-99.

Kurtz A. Control of renin synthesis and secretion. *Am J Hypertens.* 2012 Aug;25(8):839-47.

Kurtz L, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, Wagner C. Connexin expression in renin-producing cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Mar;20(3):506-12.

Lafont JE, Talma S, Murphy CL. Hypoxia-inducible factor 2alpha is essential for hypoxic induction of the human articular chondrocyte phenotype. *Arthritis Rheum.* 2007 Oct;56(10):3297-306.

Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* 2002 Feb 1;295(5556):858-61.

Lang F., Kurtz A. (2007). Niere. In Schmidt R. & Lang F., *Physiologie des Menschen.* 30. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, S.712f.

Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science.* 1993 May 28;260(5112):1317-20.

Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270(22):13333-40.

Lieubeau-Teillet B, Rak J, Jothy S, Iliopoulos O, Kaelin W, Kerbel RS. von Hippel-Lindau gene-mediated growth suppression and induction of differentiation in renal cell carcinoma cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1998 Nov 1;58(21):4957-62.

Lin Q, Kim Y, Alarcon RM, Yun Z. Oxygen and Cell Fate Decisions. *Gene Regul Syst Bio.* 2008 Feb 10;2:43-51.

Lindau A. Zur Frage der Angiomatosis Retinae und ihrer Hirnkomplikationen. *Acta Ophthalmologica.* March 1926; Volume 4, Issue 1-2, pages 193–226. (nur Abstract)

Lisztwan J, Imbert G, Wirbelauer C, Gstaiger M, Krek W. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev.* 1999 Jul 15;13(14):1822-33.

Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res.* 1995 Sep;77(3):638-43.

Lolkema MP, Mehra N, Jorna AS, van Beest M, Giles RH, Voest EE. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein influences microtubule dynamics at the cell periphery. *Exp Cell Res.* 2004 Dec 10;301(2):139-46.

Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, Kamura T, Conaway RC, Conaway JW, Kaelin WG Jr. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol.* 1998 Feb;18(2):732-41.

Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 1998 Nov;8(11):437-41.

Lutz MS, Burk RD. Primary cilium formation requires von hippel-lindau gene function in renal-derived cells. *Cancer Res.* 2006 Jul 15;66(14):6903-7.

Machura, K.: Zeitlich-räumliche Entwicklung der Reninexpression in der Mausniere, unv. Diss., Universität Regensburg 2007.

Machura K, Neubauer B, Steppan D, Kettl R, Groß A, Kurtz A. Role of blood pressure in mediating the influence of salt intake on renin expression in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 May 15;302(10):F1278-85.

Maher ER, Kaelin WG Jr. von Hippel-Lindau disease. *Medicine (Baltimore).* 1997 Nov;76(6):381-91.

Mandriota SJ, Pepper MS. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res.* 1998 Oct 19;83(8):852-9.

Matsusaka T, Miyazaki Y, Ichikawa I. The renin angiotensin system and kidney development. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:551-61.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999 May 20;399(6733):271-5.

Medrano S, Monteagudo MC, Sequeira-Lopez ML, Pentz ES, Gomez RA. Two microRNAs, miR-330 and miR-125b-5p, mark the juxtaglomerular cell and balance its smooth muscle phenotype. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Jan 1;302(1):F29-37.

Melmon KI, Rosen Sw. Lindau's Disease. Review of the literature and study of a large kindred. *Am J Med.* 1964 Apr;36:595-617.

Minchenko A, Salceda S, Bauer T, Caro J. Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. *Cell Mol Biol Res.* 1994;40(1):35-9. (nur Abstract)

Minuth M, Hackenthal E, Poulsen K, Rix E, Taugner R. Renin immunocytochemistry of the differentiating juxtaglomerular apparatus. *Anat Embryol (Berl).* 1981;162(2):173-81.

Morris BJ. Molecular biology of renin. I: Gene and protein structure, synthesis and processing. *J Hypertens.* 1992 Mar;10(3):209-14.

Morrison SJ, Csete M, Groves AK, Melega W, Wold B, Anderson DJ. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J Neurosci.* 2000 Oct 1;20(19):7370-6.

Mukherjee T, Kim WS, Mandal L, Banerjee U. Interaction between Notch and Hif-alpha in development and survival of Drosophila blood cells. *Science.* 2011 Jun 3;332(6034):1210-3.

Nakamura N, Soubrier F, Menard J, Panthier JJ, Rougeon F, Corvol P. Nonproportional changes in plasma renin concentration, renal renin content, and rat renin messenger RNA. *Hypertension.* 1985 Nov-Dec;7(6 Pt 1):855-9.

Neubauer B, Machura K, Chen M, Weinstein LS, Oppermann M, Sequeira-Lopez ML, Gomez RA, Schnermann J, Castrop H, Kurtz A, Wagner C. Development of vascular renin expression in the kidney critically depends on the cyclic AMP pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 May;296(5):F1006-12.

Nguyen G. Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clin Sci (Lond).* 2011 Mar;120(5):169-78.

O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, Pugh CW. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 1999 Jan 22;274(4):2060-71.

Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood.* 2008 May 15;111(10):5223-32.

Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Gavin BJ, Kley N, Kaelin WG Jr, Iliopoulos O. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell.* 1998 Jun;1(7):959-68.

Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol.* 2000 Jul;2(7):423-7.

Oikawa M, Abe M, Kurosawa H, Hida W, Shirato K, Sato Y. Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Nov 23;289(1):39-43.

Pan L, Glenn ST, Jones CA, Gross KW. Activation of the rat renin promoter by HOXD10.PBX1b.PREP1, Ets-1, and the intracellular domain of notch. *J Biol Chem.* 2005 May 27;280(21):20860-6.

Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. *Cell Death Differ.* 2008 Apr;15(4):628-34.

Pause A, Lee S, Worrell RA, Chen DY, Burgess WH, Linehan WM, Klausner RD. The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Mar 18;94(6):2156-61.

Pentz ES, Moyano MA, Thornhill BA, Sequeira Lopez ML, Gomez RA. Ablation of renin-expressing juxtaglomerular cells results in a distinct kidney phenotype. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Mar;286(3):R474-83.

Pentz ES, Lopez ML, Cordaillat M, Gomez RA. Identity of the renin cell is mediated by cAMP and chromatin remodeling: an in vitro model for studying cell recruitment and plasticity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Feb;294(2):H699-707.

Pistollato F, Rampazzo E, Persano L, Abbadi S, Frasson C, Denaro L, D'Avella D, Panchision DM, Della Puppa A, Scienza R, Basso G. Interaction of hypoxia-inducible factor-1α and Notch signaling regulates medulloblastoma precursor proliferation and fate. *Stem Cells.* 2010 Nov;28(11):1918-29.

Pollenz RS, Sattler CA, Poland A. The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol.* 1994 Mar;45(3):428-38.

Postic C, Magnuson MA. DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age. *Genesis.* 2000 Feb;26(2):149-50.

Pratt RE, Carleton JE, Richie JP, Heusser C, Dzau VJ. Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987 Nov;84(22):7837-40.

Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem.* 1997 Apr 25;272(17):11205-14.

Rankin EB, Tomaszewski JE, Haase VH. Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res.* 2006 Mar 1;66(5):2576-83.

Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, Simon MC, Keith B, Haase VH. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest.* 2007 Apr;117(4):1068-77.

Reddi V, Zaglul A, Pentz ES, Gomez RA. Renin-expressing cells are associated with branching of the developing kidney vasculature. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Jan;9(1):63-71.

Rosenberger C, Mandriota S, Jürgensen JS, Wiesener MS, Hörstrup JH, Frei U, Ratcliffe PJ, Maxwell PH, Bachmann S, Eckardt KU. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jul;13(7):1721-32.

Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, Kawaguchi H. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med.* 2010 Jun;16(6):678-86.

Sauter A, Machura K, Neubauer B, Kurtz A, Wagner C. Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney Int.* 2008 Jan;73(1):43-51.

Schermer B, Ghenoiu C, Bartram M, Müller RU, Kotsis F, Höhne M, Kühn W, Rapka M, Nitschke R, Zentgraf H, Fliegauf M, Omran H, Walz G, Benzing T. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein controls ciliogenesis by orienting microtubule growth. *J Cell Biol.* 2006 Nov 20;175(4):547-54.

Schnermann J, Briggs JP. Tubular control of renin synthesis and secretion. *Pflügers Arch.* 2013 Jan;465(1):39-51.

Schoenfeld A, Davidowitz EJ, Burk RD. A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Jul 21;95(15):8817-22.

Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 May;5(5):343-54.

Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, Oktay Y, Bennett MJ, Bennett M, Shelton JM, Richardson JA, Moe O, Garcia JA. HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood.* 2005 Apr 15;105(8):3133-40.

Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992 Dec;12(12):5447-54.

Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:551-78.

Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000;35(2):71-103.

Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda).* 2004 Aug;19:176-82.

Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B, Abrahamson DR, Gomez RA. Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001 Aug;281(2):F345-56.

Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Nomasa T, Smithies O, Gomez RA. Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev Cell.* 2004 May;6(5):719-28.

Sequeira-Lopez ML, Weatherford ET, Borges GR, Monteagudo MC, Pentz ES, Harfe BD, Carretero O, Sigmund CD, Gomez RA. The microRNA-processing enzyme dicer maintains juxtaglomerular cells. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Mar;21(3):460-7.

Sequeira Lopez ML, Gomez RA. Development of the renal arterioles. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Dec;22(12):2156-65.

Shimba S, Wada T, Hara S, Tezuka M. EPAS1 promotes adipose differentiation in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 2004 Sep 24;279(39):40946-53.

Shuin T, Kondo K, Torigoe S, Kishida T, Kubota Y, Hosaka M, Nagashima Y, Kitamura H, Latif F, Zbar B, et al. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 1994 Jun 1;54(11):2852-5.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992 Oct 29;359(6398):843-5.

Skinner SL, McCubbin JW, Page IH. Renal Baroreceptor Control of Renin Secretion. *Science.* 1963 Aug 30;141(3583):814-6.

Skøtt O, Briggs JP. Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science.* 1987 Sep 25;237(4822):1618-20.

Sowter HM, Raval RR, Moore JW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res.* 2003 Oct 1;63(19):6130-4.

Stebbins CE, Kaelin WG Jr, Pavletich NP. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science.* 1999 Apr 16;284(5413):455-61.

Steppan D, Zügner A, Rachel R, Kurtz A. Structural analysis suggests that renin is released by compound exocytosis. *Kidney Int.* 2013 Feb;83(2):233-41.

Stickle NH, Chung J, Klco JM, Hill RP, Kaelin WG Jr, Ohh M. pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development. *Mol Cell Biol.* 2004 Apr;24(8):3251-61.

Stolze IP, Tian YM, Appelhoff RJ, Turley H, Wykoff CC, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) in regulating hypoxia-inducible factor (HIF) transcriptional target genes [corrected]. *J Biol Chem.* 2004 Oct 8;279(41):42719-25.

Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M, Candinas D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* 2001 Nov;15(13):2445-53.

Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, Manabe I, Nagai R. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res.* 2004 Jul 23;95(2):146-53.

Tang N, Mack F, Haase VH, Simon MC, Johnson RS. pVHL function is essential for endothelial extracellular matrix deposition. *Mol Cell Biol.* 2006 Apr;26(7):2519-30.

Taugner C, Poulsen K, Hackenthal E, Taugner R. Immunocytochemical localization of renin in mouse kidney. *Histochemistry.* 1979 Jul;62(1):19-27.

Taugner R, Marin-Grez M, Keilbach R, Hackenthal E, Nobiling R. Immunoreactive renin and angiotensin II in the afferent glomerular arterioles of rats with hypertension due to unilateral renal artery constriction. *Histochemistry.* 1982;76(1):61-9.

Thoma CR, Frew IJ, Hoerner CR, Montani M, Moch H, Krek W. pVHL and GSK3beta are components of a primary cilium-maintenance signalling network. *Nat Cell Biol.* 2007 May;9(5):588-95.

Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997 Jan 1;11(1):72-82.

Thrasher TN. Unloading arterial baroreceptors causes neurogenic hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002 Apr;282(4):R1044-53.

Tufro-McReddie A, Romano LM, Harris JM, Ferder L, Gomez RA. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am J Physiol.* 1995 Jul;269(1 Pt 2):F110-5.

Von Hippel E. Über eine sehr seltene Erkrankung der Netzhaut. Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie; 9. August 1904, Volume 59, Issue 1, pp 83-106.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. Proc Natl Acad Sci USA. 1995 Jun 6;92(12):5510-4.

Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. FASEB J. 2004 Sep;18(12):1462-4.

Weidemann A, Johnson RS. Nonrenal regulation of EPO synthesis. Kidney Int. 2009 Apr;75(7):682-8.

Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. Sci STKE. 2005 Oct 18;2005(306):re12.

Whaley JM, Naglich J, Gelbert L, Hsia YE, Lamiell JM, Green JS, Collins D, Neumann HP, Laidlaw J, Li FP, et al. Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma. Am J Hum Genet. 1994 Dec;55(6):1092-102.

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . Blood. 1998 Oct 1;92(7):2260-8.

Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. FASEB J. 2003 Feb;17(2):271-3.

Woolf AS, Yuan HT. Angiopoietin growth factors and Tie receptor tyrosine kinases in renal vascular development. Pediatr Nephrol. 2001 Feb;16(2):177-84.

Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Aug 14;98(17):9630-5.

Yuan HT, Yang SP, Woolf AS. Hypoxia up-regulates angiopoietin-2, a Tie-2 ligand, in mouse mesangial cells. Kidney Int. 2000 Nov;58(5):1912-9.

Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. Dev Cell. 2002 Mar;2(3):331-41.

8.Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A. - Arteria	Enal – Enalapril
Aa. - Arteriae	EPO - Erythropoietin
Abb. - Abbildung	Ets-1 transcription factor - E-twenty six-1 transcription factor
ACE - Angiotensin-I-Konversionsenzym	Fe²⁺ - Eisen
ADH - Antidiuretisches Hormon	FIH-1 - factor-inhibiting-HIF
Ang 1-7 – Angiotensin 1-7	GLUT-1 - Glucose transporter 1
ARNT - aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	h – Stunde(n)
Asn – Asparagin	HIF – Hypoxia-inducible-factor
AT - Angiotensin-Rezeptor	HIFα - Hypoxia-inducible-factor-α
AT1 - Angiotensin-Rezeptor 1	HIFβ - Hypoxia-inducible-factor-β
AT2 - Angiotensin-Rezeptor 2	HOX - Homeobox
ATP - Adenosintriphosphat	HRE-Element - hypoxia-response-element
bHLH-PAS Proteine - basic-helix-loop-helix (bHLH)-Per-Arnt-Sim (PAS) domain containing proteins	HS - Horse Serum (Pferdeserum)
BSA - Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)	H₂KPO₄ - Kaliumdihydrogenphosphat
Ca²⁺ - Calcium	IgG - Immunglobulin G
cAMP – cyclisches Adenosinmonophosphat	IgY - Immunglobulin Y
CBP - CREB-binding protein	KCl - Kaliumchlorid
CCD - Charge-coupled Device	kDa – Kilodalton
cGMP - cyclisches Guanosinmonophosphat	K₂HPO₄ - di-Kaliumhydrogenphosphat
CoCl₂ - Cobalt(II)-chlorid	LS – low salt (Niedrigsalz)
CRE - cAMP-responsive-element	microRNA – micro ribonucleic acid (micro Ribonukleinsäure)
Cre-Rekombinase - cyclization recombination bzw. causes recombination Rekombinase	mRNA – messenger ribonucleic acid (messenger Ribonukleinsäure)
C-TAD - c-terminale Transaktivierungsdomäne	NaCl - Natriumchlorid
Cul2 - Cullin-2	NO - Stickstoffmonoxid
Cy2 - Carbocyanin	Notch ICD – Notch intracellular domain
DNA - Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)	N-TAD - n-terminale Transaktivierungsdomäne
E-Box - Enhancer Box	O₂ - molekularer Sauerstoff

ODD - Oxygen-Dependent-Degradation-Domain	SEM - Standard Error of the Mean (Standartfehler)
PBS- Puffer - Phosphate Buffered Saline	TIFF-Datei - Tagged Image File Format-Datei
PBX - Pre-B-cell leukemia homeobox	TRITC - Tetramethyl Rhodamin-Isothiocyanat
PCR - Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)	USA – United States of America
pH - pH-Wert (pondus Hydrogenii)	VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor
PHD1, PHD2, PHD3 – Prolylhydroxylasen 1, 2, 3	Vhl^{-/-REN} –Maus - reninzellspezifische Vhl-Knockout-Maus
PHD-VHLp-Weg – Prolylhydroxylase - von-Hippel-Lindau Protein - Weg	Vhl^{fl/fl} –Maus – Maus, deren beide Allele für VHLp gefloxt sind
Pro – Prolin	Vhl-Gen – Gen für VHLp
pVHL₁₉ - Von-Hippel-Lindau Protein von 19kDA	VHLp - von-Hippel-Lindau Protein
pVHL₃₀ - Von-Hippel-Lindau Protein von 30kDA	zvi-Datei - Zeiss Vision-Datei
RAAS – Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	α SMA - α smooth muscle actin
RBP-J - Recombining binding protein suppressor of hairless	µm - Mikrometer
RBP-J/Su(H)/LAG1/CBF1 - Recombining binding protein suppressor of hairless/ Suppressor of Hairless/ Longevity-assurance gene 1 /Centromere-binding factor 1	°C – Grad Celsius
Ren-1d-Promotor – Renin – 1d-Promotor	3D – dreidimensional
ROS - Reactive Oxygen Species	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung des systemischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) Abbildung nach http://www.urologielehrbuch.de/01/RAAS.jpg , letzter Aufruf: 13.08.13	S. 10
Abb. 1.2	Schematische Darstellung des vaskulären Pols eines Glomerulus.	S. 11
Abb. 1.3	Darstellung der Herkunft der Zellen, welche die Wand der afferenten Arteriole bilden.	S. 15
Abb. 1.4	Muster der Verteilung reninexprimierender Zellen während der Nierenentwicklung und dem Vorgang der sogenannten Rekrutierung im Adultstadium.	S. 16
Abb. 1.5	Veranschaulichung der hohen Sequenzhomologie zwischen HIF1 α und HIF2 α .	S. 19
Abb. 1.6	Struktureller Aufbau von HIF2 α und Bereiche, in welchen das Protein hydroxyliert wird.	S. 20
Abb. 1.7	Der klassische HIF-Signalweg und alternative Wirkweisen von HIF.	S. 21
Abb. 3.1	3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten Vhl ^{fl/fl} -Maus (links) und einer Vhl ^{-/-REN} -Maus (rechts).	S. 41
Abb. 3.2	3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten Vhl ^{fl/fl} -Maus (a) und einer Vhl ^{-/-REN} -Maus (b).	S. 42
Abb. 3.3	3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten Vhl ^{fl/fl} -Maus (links) und einer Vhl ^{-/-REN} -Maus (rechts) - Ausschnitte der in Abb. 3.1 gezeigten Rekonstruktionen.	S. 43
Abb. 3.4	3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten Vhl ^{fl/fl} -Maus (links) und einer Vhl ^{-/-REN} -Maus (rechts) nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril.	S. 43
Abb. 3.5	3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten Vhl ^{fl/fl} -Maus (a) und einer Vhl ^{-/-REN} -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril.	S. 44
Abb. 3.6	Reninvolumen, angegeben in % des unstimulierten Kontrolltiers.	S. 45
Abb. 3.7	Immunfluoreszenzfärbung von Renin an Paraffinschnitten einer Maus des Genotyps Vhl ^{fl/fl} (links) und Vhl ^{-/-REN} (rechts).	S. 46
Abb. 3.8	Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten einer Maus des Genotyps Vhl ^{fl/fl} (oben) und Vhl ^{-/-REN} (unten).	S. 47

Abb. 3.9	Immunfluoreszenzdoppelfärbung an Paraffinschnitten einer Maus des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ (oben) und $Vhl^{-/-REN}$ (unten) nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril.	S. 48
Abb. 3.10	Immunfluoreszenzfärbung von Renin an Paraffinschnitten einer Maus des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ (oben) und $Vhl^{-/-REN}$ (unten).	S. 49
Abb. 3.11	Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten einer Maus des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ (a, c) und $Vhl^{-/-REN}$ (b, d)	S. 50
Abb. 3.12	Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten einer Maus des Genotyps $Vhl^{fl/fl}$ (a, c) und $Vhl^{-/-REN}$ (b, d) nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril.	S. 51
Abb. 3.13	3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b).	S. 54
Abb. 3.14	A. interlobularis einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) – Ausschnitte aus den in Abb. 3.13 gezeigten Bäumen.	S. 55
Abb. 3.15	Terminales Ende einer A. interlobularis einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) – Ausschnitte aus den in Abb. 3.13 gezeigten Bäumen.	S. 56
Abb. 3.16	3D-Rekonstruktion eines Gefäßbaumausschnitts einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril.	S. 59
Abb. 3.17	Interlobulärer Hauptast einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril – Ausschnitte aus den in Abb. 3.16 gezeigten Rekonstruktionen.	S. 60
Abb. 3.18	Terminales Ende eines interlobulären Seitenastes einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril – Ausschnitte aus den in Abb. 3.16 gezeigten Rekonstruktionen.	S. 61
Abb. 3.19	Lagebeziehung zwischen Glomeruli und reninpositiven Zellen ermittelt aus 3D-Gefäßbaumteilrekonstruktionen der jeweiligen Genotypen.	S. 62, S. 71
Abb. 3.20	Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a, c) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b, d).	S. 65
Abb. 3.21	Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten einer adulten $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a, c) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b, d) nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril.	S. 66
Abb. 3.22	Oben: Immunfluoreszenzdoppelfärbung eines Paraffinschnitts einer adulten $Vhl^{-/-REN}$ -Maus.	S. 69

Abb. 3.23	Lagebeziehung zwischen Glomeruli und reninpositiven Zellen - Auszählungen auf immunfluoreszenzgefärbten Gewebeschnitten.	S. 71
Abb. 3.24	3D-Gefäßbaumteilrekonstruktion einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b).	S. 89
Abb. 3.25	3D-Gefäßbaumteilrekonstruktion einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b).	S. 90
Abb. 3.26	Ausschnitte aus den Gefäßbaumteilrekonstruktionen einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b).	S. 91
Abb. 3.27	Ausschnitte aus den Gefäßbaumteilrekonstruktionen einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b).	S. 92
Abb. 3.28	3D-Gefäßbaumteilrekonstruktion einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril.	S. 93
Abb. 3.29	3D-Gefäßbaumteilrekonstruktion einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril.	S. 94, S. 82
Abb. 3.30	Ausschnitte aus den Gefäßbaumteilrekonstruktionen einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril.	S. 95
Abb. 3.31	Ausschnitte aus den Gefäßbaumteilrekonstruktionen einer $Vhl^{fl/fl}$ -Maus (a) und einer $Vhl^{-/-REN}$ -Maus (b) nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril.	S. 96
Abb. 3.32	Durchschnittlicher Durchmesser der afferenten Arteriolen	S. 97
Abb. 3.33	Durchschnittliche Länge der afferenten Arteriolen in μm .	S. 99
Abb. 4.1	Renin-mRNA-Konzentrationen in der Niere (A) und Plasmareninkonzentrationen (B) in $Vhl^{fl/fl}$ -Mäusen und $Vhl^{-/-REN}$ - Mäusen unter Normalbedingungen und nach Stimulation des RAAS durch Niedrigsalzdiät und Enalapril.	S. 103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Übersicht über die Lokalisation der reninbildenden Zellen in den betrachteten Gefäßbaumteilrekonstruktionen jeweils in Bezug auf die Glomeruli.	S. 64, S. 73
Tabelle 3.2	Vhl ^{fl/fl} : Übersicht über die Lokalisation reninbildender Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli	S. 76
Tabelle 3.3	VHL ^{-/-REN} : Lokalisation der reninbildenden Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli	S. 77
Tabelle 3.4	Übersicht über die Beziehung von Glomeruli und reninbildenden Zellen in einer Gefäßbaumteilrekonstruktion einer Maus des Genotyps Vhl ^{-/-REN} nach Stimulation des RAAS durch Nidrigsalzdiät und Enalapril.	S. 80
Tabelle 3.5	Vhl ^{fl/fl} nach Stimulation des RAAS: Übersicht über die Lokalisation der reninbildenden Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli	S. 83
Tabelle 3.6	VHL ^{-/-REN} nach Stimulation des RAAS: Übersicht über die Lokalisation reninbildender Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli - betrachtet wurden nur Glomeruli mit reninpositiven Zellen in juxtaglomerulärer Position	S. 84
Tabelle 3.7	VHL ^{-/-REN} nach Stimulation des RAAS: Übersicht über die Lokalisation reninbildender Zellen im Gefäßbaum in Bezug auf die Glomeruli - betrachtet wurden nur Glomeruli mit reninpositiven Zellen aber nicht in juxtaglomerulärer Position	S. 85
Tabelle 3.8	Vhl ^{-/-REN} nach Stimulation des RAAS: Reninvorkommen an Abgängen und Gabelungen	S. 87

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Armin Kurtz für die Vergabe des Themas dieser Doktorarbeit sowie für die Bereitstellung von Arbeitsmitteln und Geräten bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich dafür, dass er stets ein offenes Ohr für seine Doktoranden hat, dass er mir jederzeit in fachlichen Fragen zur Seite stand und mich auch darüber hinaus in akademischen Angelegenheiten beraten und unterstützt hat.

Mein Dank gilt des Weiteren Frau Dr. Birgül Kurt für die Betreuung dieser Arbeit und für die Bereitstellung des für diese Arbeit benötigten tierischen Gewebes. Danke auch für fachliche Unterstützung und Beratung, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Björn Neubauer, Frau Dr. Katharina Machura, Frau Dr. Melanie Gerl sowie Frau Anna M'Bangui, die mir bei methodischen Fragen weitergeholfen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Ilona Schwarzensteiner und Dr. Dominik Steppan, die mich bei methodischen Fragen unterstützt und mir geduldig zur Seite gestanden haben.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich stets unterstützen und mir verständnisvoll und ermutigend zur Seite stehen. Auf diese Weise haben auch sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Nicht zuletzt möchte ich mich bei all den anderen bedanken, die in dieser Zeit für mich da waren und ein offenes Ohr für mich hatten.

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde durch Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz angeregt und entstand im Zeitraum von August 2011 bis September 2013 unter der Anleitung von Frau Dr. Birgül Kurt am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

Kathrin Schucht

Veröffentlichung

Kurt B, Paliege A, Willam C, Schwarzensteiner I, Schucht K, Neymeyer H, Sequeira-Lopez ML, Bachmann S, Gomez RA, Eckardt KU, Kurtz A. Deletion of von Hippel-Lindau protein converts renin-producing cells into erythropoietin-producing cells. J Am Soc Nephrol. 2013 Feb;24(3):433-44.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Familienname: Schucht
 Vornamen: Kathrin Martina Andrea
 Geburtsdatum: 12.11.1987
 Adresse: Deischgasse 4
 93047 Regensburg
 Telefonnummer: 0176 6333 6336
 E-Mail: kathrin.schucht
 @googlemail.com



Akademischer Werdegang

Mai 2015	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Universität Regensburg, Note: 1
Januar – April 2015	3. Tertial des Praktischen Jahres am Universitätsklinikum Regensburg, Fachbereich: Dermatologie
September – Dezember 2014	2. Tertial des Praktischen Jahres im Krankenhaus Bozen, Italien, Fachbereich: Chirurgie
Mai – September 2014	1. Tertial des Praktischen Jahres im Krankenhaus Kelheim, Fachbereich: Innere Medizin
April 2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Universität Regensburg, Note: 2
September – Dezember 2012	Forschungsaufenthalt an der University of California, San Diego, in der Abteilung für Nephrologie und Hypertension unter der Leitung von Prof. Dr. Volker Vallon/Dr. Timo Rieg
August 2011 – Sept. 2013	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Physiologie der Universität Regensburg, Doktorvater: Prof. Dr. Armin Kurtz, Titel der Arbeit:

Die Bedeutung von Hypoxia-inducible-factor und
des von-Hippel-Lindau Proteins für die renale
Reninexpression

September 2010 – März 2011	Auslandsstudium an der Université Catholique in Lille, Frankreich
September 2009 – März 2014	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg, Klinischer Abschnitt
August 2009	Physikum an der Universität Regensburg, Note: 1,0
Oktober 2007 – Juli 2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg, Vorklinischer Abschnitt
Juni 2007	Abitur am Gymnasium Ottobrunn, Landkreis München, Notendurchschnitt: 1,0
September 1998 – Juni 2007	Besuch des Gymnasiums Ottobrunn, Landkreis München

Praktika

Februar 2013	2-wöchige Famulatur in der Kinderarztpraxis Judex- Meinel in Regensburg
Februar 2013	1-wöchige Famulatur in der Abteilung für Kinderurologie in der Klinik St. Hedwig in Regensburg
Januar 2013	2-wöchige Famulatur in der Allgemeinarztpraxis Dr. med. Mandlinger in Regensburg
März 2012	4-wöchige Famulatur in der Notaufnahme des Krankenhauses Hôpital Saint Pierre in Brüssel, Belgien
März 2011	4-wöchige Famulatur in der Abteilung für Neurologie des Krankenhauses Hôpital St. Philibert in Lille, Frankreich
Februar 2011	4-wöchige Famulatur in der Abteilung für Urologie des Krankenhauses Hôpital St. Philibert in Lille, Frankreich
Januar 2011	4-wöchige Famulatur in der Abteilung für Dermatologie des Krankenhauses Hôpital St. Vincent-de-Paul in Lille, Frankreich

Dezember 2010	4-wöchige Famulatur in der Abteilung für Gynäkologie des Krankenhauses Hôpital St. Vincent-de-Paul in Lille, Frankreich
August 2010	4-wöchige Famulatur in der Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Hanse-Klinikums Stralsund
Februar - März 2010	4-wöchige Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin des Krankenhauses Global Hospital in Hyderabad, Indien

Fremdsprachenkenntnisse:

Englisch und Französisch:	fließend
Spanisch und Italienisch:	Grundkenntnisse

Soziales Engagement:

- Teilnahme an sozialen Projekten der Medizinstudenten der Universität Regensburg (Mediziner-Weihnachtschor, Teddyklinik, Weihnachtliches Waffelbacken)
- Mitglied der Streitschlichtergruppe des Gymnasiums Ottobrunn

Hobbies:

- Mitglied des Universitätschores der Universität Regensburg
- Musikinstrumente: Klarinette und Saxophon
- Sportliche Aktivitäten: Rudern, Fahrradfahren, Wandern, Schwimmen, Squash